

**Universidade do Algarve**

**Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina**

**Uma abordagem de metabolómica no estudo  
comparativo do metabolismo de glucose e  
galactose no patogénico humano *Streptococcus  
pneumoniae***

**Maria Teresa Maio**

FARO

2010

## **Agradecimentos**

A todos aqueles que, ao longo deste ano, acompanharam o meu trabalho e contribuíram para a realização da minha tese de mestrado. Obrigada!

À Dr<sup>a</sup> Ana Rute Neves, minha coordenadora, por ter-me aceite no seu laboratório. Gostaria de realçar a disponibilidade, motivação e empenho que demonstrou ao longo do meu ano de trabalho. Obrigada Rute.

À Dr<sup>a</sup> Paula Gaspar, por tudo aquilo que com ela aprendi, pela sua disponibilidade e constantes esclarecimentos.

À Professora Vera Ribeiro, minha co-orientadora, pela sua total disponibilidade e ajuda.

À Professora Helena Santos o facto de me ter deixado utilizar todo o seu material e equipamento, mesmo não sendo sua aluna. Sem isso o meu trabalho não seria possível de realizar.

Às minhas colegas do grupo LAB & *in vivo* NMR e aos meus colegas do grupo cell physiology & NMR, agradeço toda a ajuda. Obrigada pelas discussões sobre tudo, pelo bom ambiente, pelas gargalhadas, pelos almoços descontraídos na cantina e pela amizade demonstrada.

Às minhas amigas toda a paciência e amizade para comigo. Nuno obrigada por me teres sempre ouvido.

Aos meus pais, a paciência, o carinho e o amor que sempre demonstraram. Obrigada por terem sempre acreditado em mim.

## Resumo

O *Streptococcus pneumoniae* (ou pneumococos) é um organismo Gram-positivo e patogénico causador de doenças graves, tais como pneumonia, bacteremia e meningite e outras menos graves mas mais prevalentes tais como otites. O seu habitat natural são as mucosas da nasofarínge, onde co-existe com outra microbiota humana sem causar doença. A transição de organismo comensal a patogénico apenas ocorre quando os pneumococos invadem componentes normalmente estéreis das vias respiratórias. Durante esta progressão entre nichos ecológicos as bactérias são forçadas a adaptar-se às diferentes condições nutricionais encontrados em cada nicho. Entre os vários nutrientes, os açúcares têm um papel preponderante na fisiologia de pneumococos. Este microrganismo é estritamente fermentativo, gerando energia para crescer e se multiplicar durante a conversão de açúcares a piruvato através da via glicolítica. Posto isto, é mais do que razoável imaginar um papel importante dos açúcares na capacidade de *S. pneumoniae* causar doença invasiva.

Este trabalho tem por objectivo estudar o metabolismo de dois açúcares, a glucose e a galactose, que se sabem estar presentes em dois dos nichos frequentados por *S. pneumoniae*, o sangue e a nasofarínge, respectivamente. A primeira tarefa consistia em obter o perfil de crescimento de pneumococos estirpe R6 em ambos os açúcares (1% m/v) num meio quimicamente definido. Contudo, e embora várias tentativas, não se conseguia obter perfis de crescimento reprodutíveis. Todas as culturas eram inoculadas com uma pré-cultura crescida durante a noite nas mesmas condições da cultura principal, e iniciadas pela adição de cultura stock da estirpe R6 guardada em glicerol a -80°C. Uma caracterização detalhada da cinética do crescimento das pré-culturas permitiu concluir que a irreprodutibilidade observada nos crescimentos das culturas principais se devia principalmente ao facto de se utilizar como inóculo pré-culturas em fases distintas do crescimento. Uma vez identificado o problema, fixaram-se condições de preparação e recolha da pré-cultura (fase exponencial tardia) que permitiram então uma caracterização detalhada dos parâmetros de crescimento nos dois açúcares. Sumariamente, *S. pneumoniae* tem a capacidade de crescer quer em glucose quer em galactose como fontes únicas de energia, mas a glucose permite taxas de crescimento mais elevadas. Enquanto que o metabolismo da glucose é tipicamente do tipo homoláctico, a galactose induz um desvio metabólico a uma fermentação de ácidos

mistos, com produção de formato, acetato e etanol além de lactato. Este padrão pode em parte explicar-se pela diminuição da actividade (cerca de 8 vezes) de desidrogenase do lactato, em células crescidas em galactose. Já a actividade de cinase do piruvato é idêntica nos dois açúcares.

Uma análise completa do metabolismo não é possível sem determinar os conteúdos intracelulares em cada condição. A análise de metabolitos *in vitro* requer que a amostra utilizada para o efeito reflecta o estado metabólico de interesse. Para tal, a inactivação instantânea (*quenching* celular) do metabolismo é essencial. Quando a separação de metabolitos intracelulares e extracelulares é um requisito, é necessário garantir que o procedimento de *quenching* celular não afecte a integridade celular. Por outro lado, sabe-se que métodos de extracção apresentam desvantagens, tais como a degradação e a insolubilidade de metabolitos específicos. Para cada organismo, têm que se otimizar e validar métodos de *quenching* celular e extracção de metabolitos. Que nos estejamos conscientes, este procedimentos experimentais nunca foram aplicados a *S. pneumoniae*. Assim sendo, grande parte deste trabalho de tese consistiu em testar diferentes procedimentos de *quenching* celular (metanol a -20°C, solução aquosa a 60% de metanol a -40°C, 60% de metanol em solução de 0,85% de carbonato de amónio (pH 5,5) a -40°C), bem como diferentes métodos de extracção (perclórica, etanólica a quente, e metanólica). Concluimos que as três soluções de *quenching* celular testadas afectaram a integridade celular resultando em perdas significativas de metabolitos; no que respeita aos tipos de extracção, a extracção perclórica revelou ser a mais promissora para estudos futuros. Tendo em conta estes resultados, testámos também um método em que os procedimentos de *quenching* celular e de extracção ocorrem num só passo, pela mistura rápida de uma solução fria de ácido perclórico com cultura celular. São apresentados resultados preliminares relativos a alguns metabolitos glicolíticos. Discute-se a necessidade de testar novos métodos e/ou otimizar os aqui já utilizados para *quenching* celular e/ou extracção de metabolitos em *S. pneumoniae*.

**Palavras-chave:** *Streptococcus pneumoniae*, Metabolismo, Glucose, Galactose *Quenching*, Extracção.

## Abstract

*Streptococcus pneumoniae* (the pneumococcus) is a Gram-positive bacterium and a major human pathogen that causes several serious diseases such as pneumonia, meningitis, septicaemia, and less severe but more prevalent otitis media. *S. pneumoniae* is often found in the mucosal surface of the nasopharynx of healthy individuals. The transition from commensal to pathogenic occurs when the pneumococcus moves from the nasopharynx to the sterile parts of the respiratory tract and beyond. During this progression the bacteria encounter different nutritional environments to which they have to adapt in order to survive. Within the range of exposed carbon and energy sources, sugars play a central role in *S. pneumoniae* physiology. The microorganism is strictly fermentative, relying on glycolytic metabolism of sugars for energy production to support growth and cell division. Therefore, it is reasonable to hypothesise a major role of sugars and their metabolism in the ability of *S. pneumoniae* to cause invasive disease.

This work aims at studying metabolism of two sugars, glucose and galactose, which are known to be present in the blood and nasopharynx of humans, respectively. The first task was to obtain the growth profiles of *S. pneumoniae* R6 in a chemically defined medium supplemented with glucose or galactose (1%, w/v). However, and despite many efforts, initially we were unable to obtain reproducible growth curves. All cultures were inoculated with pre-cultures initiated by the addition of strain R6 stock culture kept in glycerol at -80°C and grown overnight in the same conditions as those used for the main culture. A detailed characterization of the growth kinetics of the pre-cultures was performed and we concluded that the irreproducibility in growth curves of the cultures arose largely from collecting pre-culture cells at different stages of growth. By setting conditions that allowed collecting the overnight pre-culture at late exponential phase we were able to overcome the observed irreproducibility in growth and obtain a detailed characterization of growth parameters in each sugar. In brief, *S. pneumoniae* has the ability to grow on glucose and galactose as sole energy sources, but glucose supported higher growth rates. While the metabolism of glucose was completely homolactic, galactose induced a metabolic shift towards a mixed acid fermentation with production of formate, acetate and ethanol in addition to lactate. This pattern could in part be explained by the much lower (about 8 times) lactate

dehydrogenase activity observed during growth on galactose. On the other hand, pyruvate kinase displayed similar activity on both sugars.

A full metabolic characterization is only possible through assessment of the levels of intracellular metabolites at a given condition. Analysis of metabolites *in vitro* requires that the sample reflects the biological status of interest. For that purpose rapid inactivation (quenching) of the metabolism is essential. When separation of extra- and intracellular metabolites is needed leakage due to the quenching procedure has to be avoided. The extraction method also poses several problems, such as degradation, solubility and recovery of the metabolites. Quenching and extraction methods have to be optimized and validated for each organism. To our knowledge, these procedures have not been applied yet to *S. pneumoniae*. A major part of this work consisted in testing different quenching procedures (cold methanol at -20°C, methanol 60% at -40°C; 60% methanol + 0.85% ammonium carbonate (pH 5,5) at -40°C) as well as different extraction procedures (perchloric extraction, boiling ethanol extraction and methanolic extraction). We concluded that all three quenching solutions led to extensive leakage of metabolites; regarding the extraction procedures, perchloric extraction appeared as the most promising. Taken these results, a method combining in one step quenching and extraction with cold perchloric acid was also tested. Preliminary data on the levels of key glycolytic metabolites during growth on glucose or galactose are presented. The need to further test and/or optimize the current protocols for quenching and extraction of metabolites in *S. pneumoniae* is discussed.

**Keywords:** *Streptococcus pneumoniae*, Metabolism, Glucose, Galactose, Quenching, Extraction.

# Índice

Agradecimentos.....	ii
Resumo.....	iii
Palavras-chave.....	iv
Abstract.....	v
Keywords.....	vi
Índice.....	vii
Abreviaturas.....	ix
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	1
1.1.1 Características gerais.....	1
1.1.2 Metabolismo da glucose e da galactose.....	4
1.2. Análise de metabolómica.....	9
1.2.1. Amostragem.....	12
1.2.2. <i>Quenching</i> celular.....	13
1.2.3. Extracção de metabolitos intracelulares.....	15
1.2.4. Quantificação de metabolitos.....	17
1.3. Sinopse do trabalho apresentado.....	18
<b>2. Materiais e métodos.....</b>	<b>19</b>
2.1. Microrganismo e condições de cultura.....	19
2.2. Comparação de métodos de <i>quenching</i> celular.....	21
2.2.1. Teste de degradação da frutose 1,6-bisfosfato.....	22
2.3. Comparação de métodos para extracção de metabolitos.....	23
2.3.1. Teste de eficiência/qualidade do método de <i>quenching</i> celular.....	24
2.3.2. Comparação da extracção perclórica conjugada ou não com o <i>quenching</i> celular.....	24
2.4. Conteúdos intracelulares durante o crescimento em glucose e galactose.....	25
2.5. Quantificação de metabolitos intracelulares por métodos enzimáticos.....	26
2.6. Quantificação de produtos de fermentação.....	27
2.7. Medição de actividades enzimáticas.....	27
2.8. Determinação da concentração da proteína.....	28
<b>3. Resultados e discussão.....</b>	<b>30</b>

3.1. Optimização das condições de crescimento de pré-culturas e culturas.....	30
3.2. Caracterização do crescimento de <i>S. pneumoniae</i> R6 em glucose e galactose.....	33
3.3. Efeito do açúcar nas actividades enzimáticas da desidrogenase do lactato (LDH) e da cinase do piruvato (PK) de <i>S. pneumoniae</i> R6.....	37
3.4. Determinação de conteúdos em metabolitos intracelulares.....	38
3.4.1. Estudo comparativo de métodos de <i>quenching</i> celular e de extracção de metabolitos aplicados a <i>S. pneumoniae</i> .....	38
3.4.2. Estudo comparativo do método de <i>quenching</i> celular.....	40
3.4.3. Estudo da degradação da FBP pelo processo de <i>quenching</i> celular.....	41
3.4.4. Estudo comparativo de métodos de extracção de metabolitos.....	42
3.4.5. Estudo comparativo da extracção perclórica conjugada ou não, com <i>quenching</i> celular em amostras de uma mesma cultura de <i>S. pneumoniae</i> R6.....	44
3.4.6. Comparação dos níveis de metabolitos de <i>S. pneumoniae</i> R6 cultivado em glucose e galactose.....	46
<b>4. Considerações Finais.....</b>	<b>49</b>
<b>5. Bibliografia.....</b>	<b>51</b>



## Abreviaturas

ADP	Adenosina 5'-bisfosfato
ATP	Adenosina 5'-trisfosfato
CDM	Meio quimicamente definido
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
FBP	Frutose 1,6-bisfosfato
GAP	Gliceraldeído 3-fosfato
LDH	Desidrogenase do Lactato
MOPS	Tampão ácido 3-morfolinopropano sulfónico
NADH	Dinucleótido de dihidronicotinamida-adenina
NAD <sup>+</sup>	Dinucleótido de nicotinamida-adenina
PFL	Liase do piruvato cinase
3-PGA	3-fosfoglicerato
PK	Cinase do piruvato
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEP: PTS	Sistema de fosfoenolpiruvato:fosfotransferase

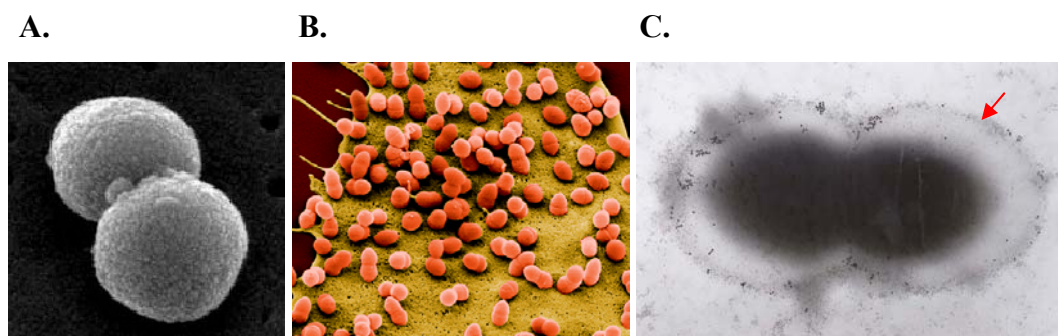
# 1. Introdução

## 1.1. *Streptococcus pneumoniae*

### 1.1.1. Características gerais

O *Streptococcus pneumoniae* (ou pneumococos, Figura 1.1) é a causa bacteriana mais frequente de doenças infecciosas em crianças e idosos, tais como otites, pneumonias adquiridas na comunidade e meningites. De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS, <http://www.who.int/wer>) 1 a 3 milhões das mortes anuais a nível mundial são devidas a infecções por pneumococos.

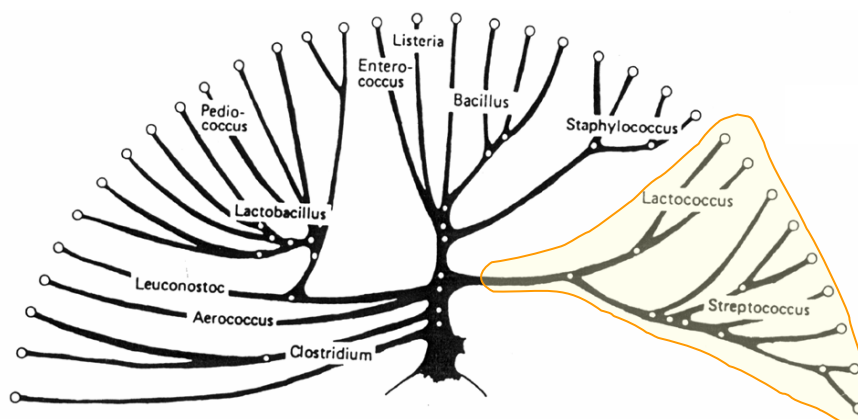
Este importante agente patogénico foi isolado pela primeira vez, e de forma independente, na década de 80 do século XIX pelo médico e bacteriologista americano George M. Sternberg e pelo químico e bacteriologista francês Louis Pasteur. Foi também por esta altura que se identificou como sendo a causa maior de pneumonia lobar humana (López, 2006; Gray e Musher, 2008). Durante anos foi conhecido como *Diplococcus pneumoniae*.



**Figura 1.1.** *Streptococcus pneumoniae*. Imagens de microscopia electrónica de varrimento de *S. pneumoniae* em cadeia curta (diplococo) (A) e na superfície de células epiteliais humanas (B). Imagem de imunomicroscopia electrónica. A seta vermelha indica a cápsula. (C). As imagens foram adaptadas das apresentadas em “Center for Disease Control CDC/Janice Carr” (A), ilustração de capa da revista científica Microbiology-SGM, Vol. 152, 2006 (B), <http://genome.microbio.uab.edu/strep/> (C).

O surgimento de novas técnicas bioquímicas e moleculares para identificação taxonómica levou à classificação de pneumococos no género *Streptococcus*, pertencente à família Streptococcaceae, que inclui também o género *Lactococcus* (Schleifer *et al.*, 1985) (Figura 1.2). O género *Streptococcus* é relativamente variado e compreende um

número de microrganismos clinicamente relevantes (ex. *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. mutans*), bem como bactérias usadas em fermentações lácteas (ex. *S. thermophilus*).

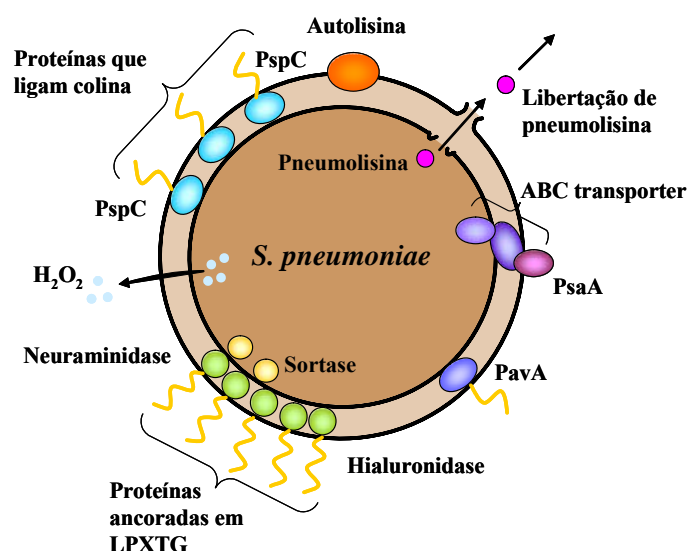


**Figura 1.2.** Árvore filogenética do ramo *Clostridium* de bactérias Gram-positivas com baixo teor de GC. A família Streptococcaceae aparece destacada do ramo principal (sombreado a amarelo). Em (Teuber *et al.*, 1992).

Os estreptococos são bactérias Gram-positivas com forma de cocos e dimensões que variam entre 0,5 e 1,25  $\mu\text{m}$ . Podem formar cadeias de comprimento variado, mas é frequente visualizar-se *S. pneumoniae* agrupado aos pares (diplococos, Figura 1.1). *S. pneumoniae* não forma esporos, vacúolos, grânulos visíveis ou flagelos e, portanto são imóveis. Quando cultivados em agár de sangue são alfa-hemolíticos, i.e., caracterizam-se por lise enzimática de glóbulos vermelhos (hemólise) incompleta. O pneumococo é nutricionalmente exigente, anaeróbio aerotolerante, catalase negativo e com uma temperatura ótima de crescimento de 37°C. É uma bactéria produtora de ácido láctico estritamente fermentativa (fermentação homoláctica) (Tuomanen, 2006). Sendo um organismo nutricionalmente exigente, necessita de vários nutrientes que, normalmente são fornecidos através do sangue ou das secreções mucosas no seu habitat natural, ou em meios de cultivo complexos no laboratório.

Embora o pneumococo seja bem conhecido como agente patogénico, trata-se de uma bactéria comensal cujo nicho ecológico é a nasofaringe dos humanos. Estima-se que a taxa de prevalência seja de aproximadamente de 50% em crianças e cerca de 10% em adultos saudáveis (Bogaert *et al.*, 2004). A transição de bactéria comensal para oportunista patogénica ocorre, geralmente, após outra infecção respiratória ou em indivíduos imunocomprometidos (Dowson, 2004; Bogaert *et al.*, 2004). Embora os mecanismos moleculares envolvidos na transição colonização-infecção não tenham sido

ainda totalmente elucidados, é bem sabido que *S. pneumoniae* sintetiza diversos factores que são determinantes na virulência do mesmo (Figura 1.3) (Hava *et al.*, 2003; Kadioglu *et al.*, 2008). Estes incluem a cápsula polissacárida (Figura 1.1.C), componentes da parede celular, diversas proteínas, tais como a pneumolisina, a neuraminidase, a hialuronidase e a autolisina, bem como pequenas moléculas inorgânicas (ex. peróxido de hidrogénio) (Kadioglu *et al.*, 2008). Entre todos, a cápsula constitui uma condição *sine qua non* para a patogenicidade do organismo, e a perda de cápsula resulta em avirulência (Ogunniyi *et al.*, 2002). Até à data foram identificados 91 polissacáridos capsulares (serovares ou serótipos) (Mavroidi *et al.*, 2007), e a sua função principal é a de inibir a fagocitose das bactérias por macrófagos (Abeyta *et al.*, 2003).



**Figura 1.3.** Principais factores de virulência em *S. pneumoniae*. Adaptado de (Mitchell, 2003).

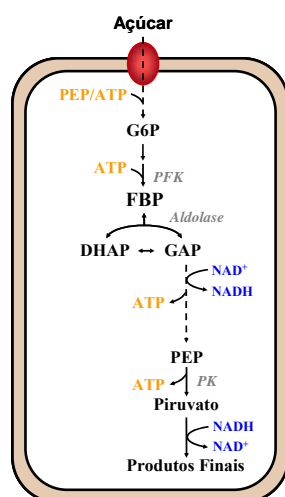
Nas últimas décadas houve contribuições significativas para a compreensão da infecção por estreptococos, nomeadamente no que respeita à expressão de factores de virulência, interacção patogénico-hospedeiro e resposta imunitária do hospedeiro, compiladas entre outros nos seguintes artigos de revisão (Kadioglu *et al.*, 2008; Mitchell, 2003; Kadioglu e Andrew, 2004; Hava *et al.*, 2003). No entanto, se por um lado o desenvolvimento de vacinas (prevenção) de largo espectro tem sido dificultado pelo grande número de serótipos (tipos de cápsula), é já sabido que a redução na prevalência dos serótipos vacinais aparece associado a um aumento de outros serótipos (Nunes *et al.*, 2008; Sá-Leão *et al.*, 2009; Dagan, 2009). Mais ainda, o aumento e a

propagação da resistência de *S. pneumoniae* a antibióticos, é preocupante (Dowson e Trzcinski, 2001; Reinert, 2009), fazendo com que seja urgente procurar alvos para novos anti-bacterianos.

Curiosamente, o conhecimento sobre processos fisiológicos básicos em *S. pneumoniae* é actualmente limitado, embora se comece a reconhecer uma relação estreita entre patogenicidade e a eficiente aquisição e metabolismo de nutrientes necessários ao crescimento e proliferação (Shelburne *et al.*, 2008). De importância para este estudo, é a variação de factores ambientais encontrada para *S. pneumoniae* nos diferentes nichos por si frequentados no hospedeiro (colonização – nasofaringe; infecção – pulmões, sangue, cérebro), nomeadamente no que respeita ao nível e composição em açúcares. No sangue a concentração em glucose é cerca de mil vezes superior à da nasofaringe, onde ocorrem derivados de açúcares glicosilados constituintes das secreções mucosas. Segue-se uma descrição do metabolismo dos açúcares glucose e galactose em *S. pneumoniae* e/ou bactérias relacionadas.

### 1.1.2. Metabolismo da glucose e da galactose

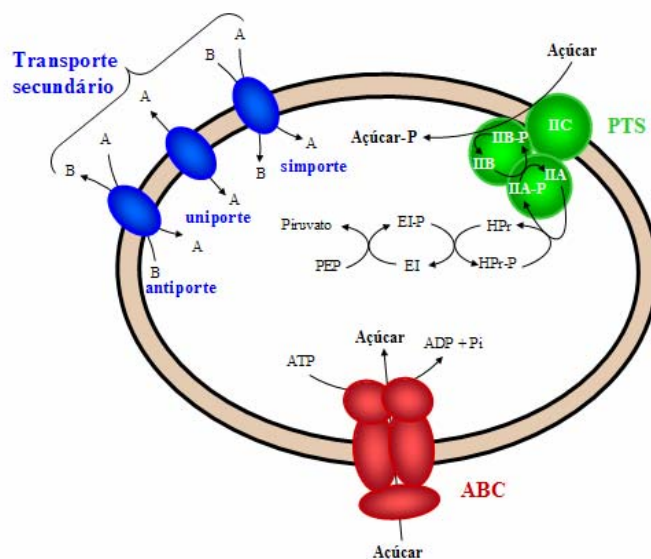
Nas bactérias fermentativas da família das Streptococcaceae o metabolismo de açúcares é um processo fisiológico central. De facto, estas bactérias obtêm a energia (ATP) necessária para se dividirem e proliferar por fosforilação ao nível do substrato no processo de oxidação incompleta de açúcares a piruvato através da via glicolítica, neste caso a via de Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) (Figura 1.4).



**Figura 1.4.** Representação esquemática geral do metabolismo de açúcares em bactérias da família das Streptococcaceae. As enzimas chave da via glicolítica de Embden-Meyerhoff-Parnas estão destacadas a cinzento. Os passos em que há consumo ou produção de energia (ATP) e transferência de electrões através das coenzimas  $\text{NAD}^+$  e  $\text{NADH}$  aparecem assinalados. PFK, cinase da frutose 6-fosfato; Aldolase, aldolase da frutose 1,6-bisfosfato; PK, cinase do piruvato.

Deste modo, não é de estranhar que um dos mecanismos mais importantes de regulação genética em bactérias fermentativas (bem como em outras) seja a repressão catabólica por açúcares, também conhecida como utilização hierárquica e coordenada de açúcares (Deutscher *et al.*, 2006). Quando confrontadas com uma imensa variedade de açúcares, as bactérias optam por uma fonte preferencial, como a glucose, em detrimento de outras no sentido de manter uma eficiência máxima de crescimento. A utilização simultânea de açúcares é metabolicamente desfavorável dada a especificidade das vias catabólicas destes nutrientes.

O primeiro passo no metabolismo de qualquer nutriente é o transporte através da membrana citoplasmática. Em bactérias, o transporte de açúcares ocorre por três mecanismos diferentes (Figura 1.5): (i) translocação de grupo (sistema de fosfoenolpiruvato:fosfotransferase, PTS), em que o substrato é transportado e simultaneamente fosforilado, sendo o dador do grupo fosfato o fosfoenolpiruvato (PEP) (Postma *et al.*, 1993); (ii) transporte activo secundário (uniporte, simporte, antiporte), em que o transporte está associado a um gradiente químico ou electroquímico de outros solutos (Poolman e Konings, 1993); e (iii) transporte activo primário (sistema ABC), em que a translocação do açúcar está acoplada à hidrólise de ATP (ATPases) (Erhmann *et al.*, 1998).



**Figura 1.5.** Sistemas de transporte de açúcares em bactérias. Adaptado de (Castro, 2009).

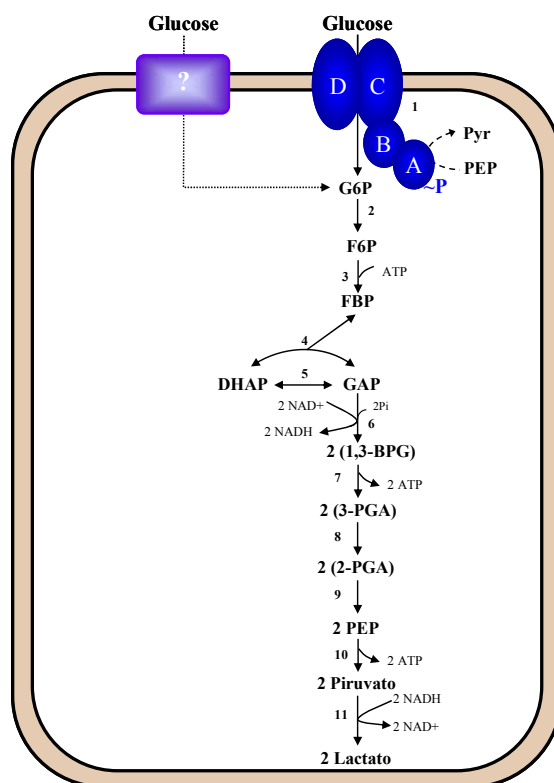
Os vários tipos de transportadores estão representados em bactérias da família Streptococcaceae (Lorca *et al.*, 2007). Está presente no genoma de *S. pneumoniae* um

número elevado de genes codificantes de transportadores de açúcares (Tettelin *et al.*, 2001; Hoskins *et al.*, 2001; Lanie *et al.*, 2007). Curiosamente, estes transportadores são maioritariamente do tipo PTS (~ 24) e ABC (~ 8), sendo que apenas um gene apresenta homologia com sistemas de transporte activo secundário. Salvo raras excepções, desconhece-se a função dos diferentes sistemas de transporte codificados no genoma de *S. pneumoniae* (Iyer e Camilli, 2007; Oggioni *et al.*, 2009 - Europneumo).

O açúcar glucose é reconhecido como uma fonte de carbono preferencial para bactérias (Deutscher *et al.*, 2006; Jahreis *et al.*, 2008). Este açúcar é abundante na Natureza, quer na forma de monossacárido quer como constituinte de polissacáridos de reserva ou estruturais. O seu nível no sangue, um dos potenciais nichos ecológicos de *S. pneumoniae* (doença invasiva), encontra-se em concentrações significativas (Shelburne *et al.*, 2008). O transporte de glucose em *Lactococcus lactis*, uma bactéria filogeneticamente relacionada com *S. pneumoniae*, foi recentemente elucidado:

*L. lactis* possui dois sistemas de transporte do tipo PTS (manose-PTS, PTS<sup>Man</sup> e celobiose-PTS, PTS<sup>Cel</sup>) e um sistema de transporte activo secundário (GlcU) (Castro *et al.*, 2009). Até à data, uma caracterização do transporte de glucose em *S. pneumoniae* não está reportada. No entanto, existem no seu genoma genes cujos produtos são homólogos dos diferentes domínios do PTS<sup>Man</sup>. Este sistema de transporte é tido como o principal translocador de glucose em muitas bactérias do filo Firmicutes ao qual pertence a família Streptococcaceae (Jahreis *et al.*, 2008). Assim sendo, é válido assumir que em *S. pneumoniae* a glucose é transportada e concomitantemente fosforilada pelo PTS<sup>Man</sup> (Figura 1.6). Contudo, não é de excluir a presença de outros transportadores com afinidade para glucose. Uma vez na forma de glucose 6-fosfato, este composto é convertido em frutose 1,6-bisfosfato pela acção sequencial de duas enzimas, a isomerase da glucose 6-fosfato e a cinase da frutose 6-fosfato. No passo seguinte a frutose 1,6-bisfosfato é clivada, originando dois metabolitos com três átomos de carbono, a dihidroxiacetona fosfato e o gliceraldeído 3-fosfato, sendo este último convertido em 1,3-bisfosfoglicerato numa reacção redox em que o aceitador de electrões é a coenzima NAD<sup>+</sup>. O intermediário 1,3-bisfosfoglicerato é finalmente transformado em piruvato pela acção sucessiva de várias enzimas (Figura 1.6). Para que a glicólise (EMP) funcione tem que haver regeneração do NAD<sup>+</sup> consumido no passo redox. Esta regeneração dá-se preferencialmente através da redução de piruvato a lactato, catalisada pela desidrogenase do lactato, em que o dador de electrões é forma reduzida de NAD<sup>+</sup>, isto é, NADH (Yesilkaya *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2008- ISPPD). Portanto, *S.*

*pneumoniae* transforma glucose em lactato, através de um processo metabólico designado homofermentativo.

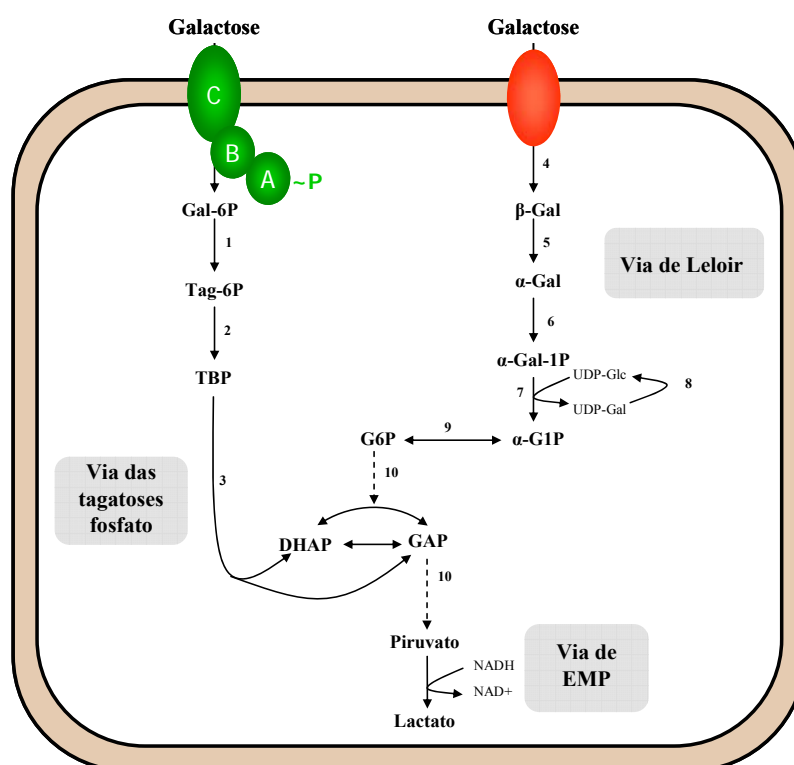


**Figura 1.6.** Representação esquemática do metabolismo de glucose em *S. pneumoniae*. As reacções representadas são catalizadas pelas seguintes enzimas: 1. sistema manose-fosfoenolpiruvato: fosfotransferase (PTS<sup>Man</sup>); 2. isomerase da glucose 6-fosfato; 3. cinase da frutose 6-fosfato; 4. aldolase da frutose 1,6-bisfosfato; 5. isomerase dos fosfatos de trioses; 6. desidrogenase do gliceraldeído 3-fosfato; 7. cinase do 3-fosfoglicerato; 8. mutase do fosfoglicerato; 9. enolase; 10. cinase do piruvato; 11. desidrogenase do lactato. Abreviaturas: G6P, glucose 6-fosfato; F6P, frutose 6-fosfato; FBP, frutose 1,6-bisfosfato; GAP, gliceraldeído 3-fosfato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; 1,3-BPG 1,3-bisfosfoglicerato; 3-PGA, 3-fosfoglicerato; 2-PGA, 2-fosfoglicerato; PEP, fosfoenolpiruvato.

A galactose é um substrato menos comum que a glucose, e é normalmente considerado um substrato pouco favorável para o crescimento bacteriano. Em *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans* e *L. lactis* o metabolismo da galactose está sujeito a repressão catabólica por glucose (Shelburne *et al.*, 2008; Abranches *et al.*, 2008; Zomer *et al.*, 2007). Na nasofaringe humana, a galactose é um dos açúcares que resultam da desglicolisação de glicoproteínas, nomeadamente as mucinas presentes em grande abundância no muco que reveste as mucosas (King *et al.*, 2006). Na Figura 1.7 estão representadas as possíveis vias metabólicas para dissimilação de galactose em Streptococcaceae: a via das tagatoses fosfato e a via de Leloir. Na via das tagatoses fosfato, a galactose é fosforilada concomitantemente com o processo de transporte para



dentro da célula (sistema PTS); uma vez na forma de galactose 6-fosfato é convertida a fosfatos de trioses, intermediários da via glicolítica, pela acção sequencial das enzimas isomerase da galactose 6-fosfato, cinase da tagatose 6-fosfato e aldolase da tagatose 1,6-bisfosfato (Figura 1.7). Quando metabolizada pela via de Leloir, a galactose é internalizada por uma permease do tipo não-PTS (ABC ou transporte activo secundário) e metabolizada pelas enzimas específicas da via a  $\alpha$ -glucose 1-fosfato, que por sua vez é convertida pela acção da  $\alpha$ -fosfoglucomutase a glucose 6-fosfato, entrando assim na via de EMP (Figura 1.7).

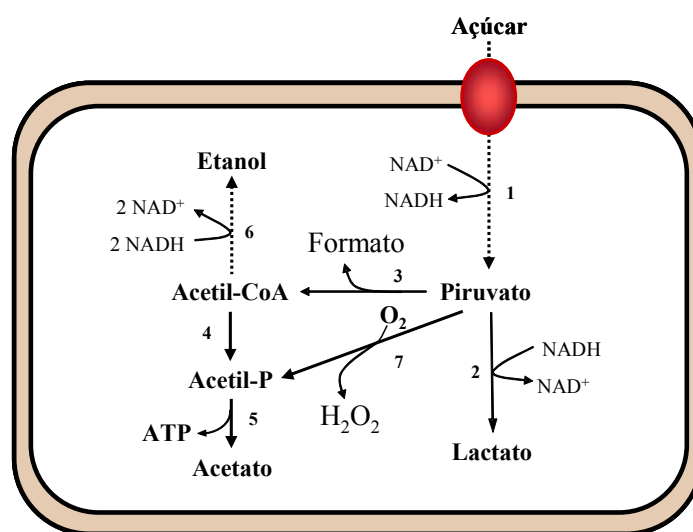


**Figura 1.7.** Representação esquemática das possíveis vias para o transporte e passos iniciais do metabolismo da galactose. As reacções são catalizadas pelas seguintes enzimas: 1. isomerase da galactose 6-fosfato; 2. cinase da tagatose 6-fosfato; 3. aldolase da tagatose 1,6-bisfosfato; 4. permease da galactose; 5. galactose mutarotase; 6. galactocinase; 7. uridililtransferase da galactose 1-fosfato; 8. 4-epimerase da UDP-galactose; 9. fosfoglucomutase; 10. enzimas da via glicolítica. Abreviaturas: Gal, galactose; Gal-6P, galactose 6-fosfato; Tag-6P, tagatose 6-fosfato; TBP, tagatose 1,6-bisfosfato; Gal-1P, galactose 1-fosfato; G1P, glucose 1-fosfato; G6P, glucose 6-fosfato; GAP, gliceraldeído 3-fosfato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; UDP-Glc, UDP-glucose; UDP-Gal, UDP-galactose.

Os sistemas de transporte e metabolismo para a galactose estão bem documentados para outros organismos pertencentes à família das Streptococcaceae, tais como *L. lactis* e *S. mutans* (Thomas *et al.*, 1980; Grossiord *et al.*, 1998; Abranches *et al.*, 2004). No que respeita a *S. pneumoniae* a informação existente restringe-se à proveniente por análise dos genomas (Hoskins *et al.*, 2001; Tettelin *et al.*, 2001); foram

encontrados genes cujos produtos são homólogos de enzimas específicas quer da via das tagatoses fosfato, quer da via de Leloir. Que via está operacional e em que condições, é uma questão que merece futuro esclarecimento.

Sabe-se que em *L. lactis* e outras Streptococcaceae existem determinados parâmetros que influenciam o destino do produto final da glicólise, piruvato, que pode ser convertido em vários compostos nomeadamente, formato, acetato, etanol, acetoína, e 2,3-butanodiol (Neves *et al.*, 2005). *S. pneumoniae* está equipado com a maquinaria enzimática que permite converter piruvato em etanol e acetato (Figura 1.8); a enzima-chave deste tipo de fermentação é a liase do piruvato-formato que converte o piruvato em formato e acetil-Coenzima A, e o gene que a codifica foi recentemente identificado em *S. pneumoniae* no âmbito de uma colaboração com o nosso grupo (Yesilkaya *et al.*, 2009). Adicionalmente, existe uma actividade em *S. pneumoniae*, oxidase do piruvato, que cataliza, na presença de oxigénio, a conversão de piruvato a acetil-fosfato com produção de peróxido de hidrogénio (Figura 1.8, Belanger *et al.*, 2004).



**Figura 1.8.** Vias alternativas do metabolismo do piruvato em *S. pneumoniae*. As reacções são catalizadas pelas seguintes enzimas: 1. enzimas da via glicolítica; 2. desidrogenase do lactato; 3. liase do piruvato formato; 4. fosfotransacetilase; 5. cinase do acetato; 6. desidrogenase do etanol; 7. oxidase do piruvato.

## 1.2. Análise de metabolómica

Os metabolitos ou intermediários das reacções bioquímicas desempenham um papel extremamente importante na interacção entre as diversas componentes celulares, nomeadamente através de mecanismos de regulação directa e/ou indirecta (Figura 1.9). Os conteúdos intracelulares em metabolitos são uma consequência directa das

concentrações e propriedades das enzimas, cuja quantidade e actividade pode depender directamente do conteúdo de um determinado metabolito (regulação por retroactivação positiva ou negativa). Logo, os conteúdos intracelulares em cada instante são uma função complexa de diferentes processos regulatórios, tais como regulação da transcrição e de transdução, regulação de interacções proteína-proteína e regulação metabólica das proteínas pelos metabolitos (Villas-Bôas *et al.*, 2004; Mashego *et al.*, 2007). Nesta perspectiva, o conteúdo em metabolitos representa não mais que informação integrada da função celular, e portanto define o fenótipo celular numa determinada condição.

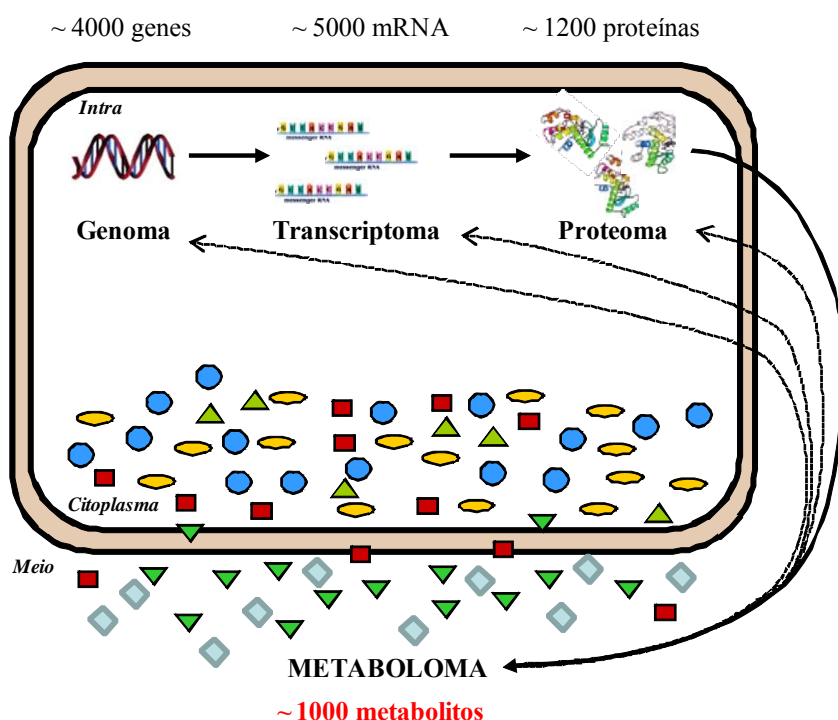


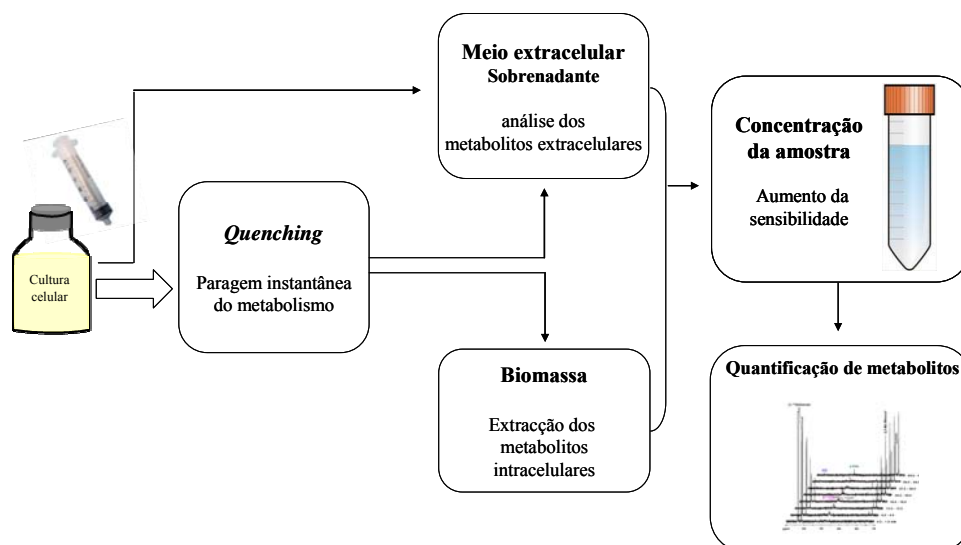
Figura 1.9. Análise de metaboloma no contexto pós-genómico. Setas a tracejado indicam processos de regulação e a seta contínua indica o processo de formação. Figura adaptada de Villas-Bôas *et al.*, 2004.

Grande parte dos metabolitos intracelulares está envolvida em diversas reacções bioquímicas, e estes estabelecem a ligação entre as diferentes vias metabólicas, que no seu conjunto constituem a rede metabólica celular (Nielsen, 2003). Uma análise detalhada dos conteúdos em metabolitos celulares, bem como dos mecanismos de regulação subjacentes, é essencial para uma compreensão alargada da fisiologia celular. Acesso a este tipo de informação permitirá gerar impressões metabólicas de microrganismos, determinar fluxos metabólicos e partição de fluxos, determinar

cinéticas enzimáticas, identificar fenótipos, e determinar efeitos devidos a variação de condições ambientais ou mutações genéticas. Espera-se que este conhecimento tenha um grande impacto em áreas de ponta como a Engenharia Metabólica ou a recentemente criada disciplina de Biologia dos Sistemas (Nielsen, 2001; Buchholz *et al.*, 2002).

O conjunto total de metabolitos (moléculas de pequena dimensão) que resultam do metabolismo celular define-se como metaboloma (Figura 1.9). A análise do metaboloma ou metabolómica, termo inicialmente criado na década de 90, define-se como o estudo dos conteúdos de todos os metabolitos intracelulares e extracelulares (metaboloma). Na prática, é impossível detectar todos os metabolitos visto não existir nenhum método analítico que o permita, logo metabolómica emprega-se como sinónimo de uma abordagem experimental que permita analisar um grupo de metabolitos de interesse. De forma a aumentar o número de metabolitos detectados e/ou doseados aplicam-se diferentes técnicas analíticas a uma mesma amostra (Schaub *et al.*, 2006; Buchholz *et al.*, 2002). Do ponto de vista metodológico, existem duas estratégias principais numa abordagem de metabolómica: (i) a análise dirigida, e (ii) o estudo do perfil metabólico. A análise dirigida define-se como um estudo quantitativo de um único metabolito ou de um grupo restrito de metabolitos. Neste caso, os procedimentos analíticos devem incluir a identificação e quantificação dos metabolitos seleccionados na amostra. O estudo do perfil metabolómico tem por objectivo a análise de um grande número de metabolitos ou mesmo de todos os metabolitos produzidos pela célula. Este estudo engloba a determinação de metabolitos intracelulares e extracelulares através de uma ou várias técnicas analíticas combinadas (Villas-Bôas *et al.*, 2004; Oldiges e Takors, 2005).

Uma compreensão quantitativa do metabolismo microbiano e da sua regulação *in vivo*, requer uma análise quantitativa dos metabolitos intracelulares e extracelulares. Os metabolitos extracelulares são quantificados rotineiramente a partir de sobrenadantes obtidos por centrifugação de culturas celulares a baixas temperaturas (Figura 1.10). Em contraste, a análise quantitativa de metabolitos intracelulares é relativamente complexa, e envolve diversos passos experimentais: (i) rápida amostragem, (ii) paragem imediata do metabolismo – *quenching* celular (iii), extracção de metabolitos, e (iv) quantificação de metabolitos (Figura 1.10) (Schaub *et al.*, 2006; Mashego *et al.*, 2007).



**Figura 1.10.** Esquema geral dos principais passos envolvidos na preparação de uma amostra para análise quantitativa de metabolitos celulares. Imagem adaptada de Villas-Bôas *et al.*, 2004.

### 1.2.1. Amostragem

Na análise metabólica, o passo de amostragem deve ser efectuado num espaço de tempo muito curto ( $\sim 1$  s), e de uma forma sistemática, assegurando nas diferentes amostras a comparar, que os processos fisiológicos foram interrompidos na mesma fase, e que todas as reacções bioquímicas serão paradas em simultâneo e imediatamente no passo seguinte de *quenching* celular (Villas-Bôas *et al.*, 2004).

A aplicação de técnicas de amostragem no sentido de medir concentrações fiáveis de metabolitos intracelulares só será bem sucedida se: (i) uma amostra representativa for retirada de um cultivo sem perturbar o crescimento, (ii) a inactivação do metabolismo na amostra for rápida comparada com as taxas de reacção metabólicas, (iii) a extracção dos metabolitos intracelulares e a desnaturação e separação das enzimas intracelulares for completa, (iv) a paragem do metabolismo e o processo de extracção não afectarem a estabilidade dos metabolitos, (v) a diluição por inactivação e/ou extracção for controlada, reprodutível e mínima, e (vi) a taxa de amostragem for suficientemente grande para estudar a dinâmica rápida das reacções metabólicas (Schaefer *et al.*, 1999).

O passo de amostragem pode ser manual ou automático. A amostragem manual é um processo mais económico em termos de equipamento, visto ser frequentemente efectuado com recurso a seringas plásticas para dosear a amostra; no entanto, nos casos em que o objectivo é obter cinéticas dos conteúdos intracelulares, a amostragem manual, não só é mais lenta, como requer imensa mão-de-obra em recursos humanos

(Theobald *et al.*, 1997). Na última década têm-se desenvolvido diversos dispositivos para automatizar o processo de amostragem (revistos em Oldiges e Takors, 2005; Mashego *et al.*, 2007; Villas-Bôas *et al.*, 2004). Estes dispositivos estão frequentemente acoplados a bioreactores e permitem a rápida amostragem seguida de mistura com uma solução de *quenching* celular num mesmo passo (Shaefer *et al.*, 1999; Lange *et al.*, 2001; Visser *et al.*, 2002; Buziol *et al.*, 2002; Schaub *et al.*, 2006; Hiller *et al.*, 2007).

### 1.2.2. *Quenching* celular

O *quenching* celular define-se como um processo de paragem instantânea do metabolismo celular, normalmente através de mudanças drásticas de temperatura (inferiores a -40°C ou superiores a 80°C) ou de pH (meio alcalino ou ácido) (Mashego *et al.*, 2007; Villas-Bôas *et al.*, 2004). O processo de *quenching* celular só pode ser considerado eficiente quando a inactivação do metabolismo é mais rápida do que as taxas de reacção metabólicas, numa escala de tempo da ordem dos sub-segundos. Para microrganismos em crescimento a conversão dos metabolitos intracelulares pode ser extremamente rápida (Faijes *et al.*, 2007; Oldiges e Takors, 2005). Correntemente, usam-se duas metodologias para paragem instantânea de metabolismo celular e extracção de metabolitos: uma em que os dois processos se realizam em simultâneo (não há separação de metabolitos intra e extracelulares) e outra em que os dois processos são sequenciais, a extracção de metabolitos só é efectuada a seguir ao passo de *quenching* e separação do meio extracelular por centrifugação. No primeiro caso a solução de *quenching* celular causa também extracção dos metabolitos intracelulares devido à disrupção da parede celular. Neste caso, os metabolitos extracelulares e intracelulares são quantificados na mesma amostra. Idealmente, *quenching* celular e a extracção de metabolitos são processos independentes. Após inactivação instantânea do metabolismo a biomassa é separada do meio extracelular por centrifugação, seguindo-se um passo de lavagem e só depois a extracção dos metabolitos intracelulares (Villas-Bôas *et al.*, 2004). As vantagens da separação do método de *quenching* celular e de extracção são a separação dos metabolitos intracelulares dos extracelulares e dos nutrientes no meio de cultivo, o que permite uma maior concentração da amostra que contém os metabolitos intracelulares, faculta a análise (menor complexidade das amostras) e que aumenta a probabilidade de detectar um maior número de metabolitos, além de permitir uma distinção clara entre metabolitos intra e extracelulares (Villas-Bôas *et al.*, 2004; Oldiges e Takors, 2005; Hiller *et al.*, 2007; Wellerdiek *et al.*, 2008).

Os métodos de *quenching* celular descritos na literatura são diversos (Tabela 1.1). Entre outros, destacam-se as soluções de metanol a frio, azoto líquido e ácido perclórico a frio para inativação instantânea do metabolismo. Os procedimentos metodológicos encontram-se descritos para diferentes organismos (Wittman *et al.*, 2004; Buziol *et al.*, 2002; Maharjan e Ferenci, 2003).

**Tabela 1.1.** Métodos de *quenching* celular aplicados a microrganismos

Microrganismo	Métodos aplicados	Método mais adequado	Referências
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	60% metanol <sup>a</sup> (-58°C)	Todas as soluções de metanol originam perdas consideráveis de metabolitos.	Wittman <i>et al.</i> , 2004; Bolten <i>et al.</i> , 2007; Wellerdiek <i>et al.</i> , 2008
	60% metanol/10 mM HEPES (-58°C)		
	0,9% NaCl (-0,5°C)	Em alternativa, um método de filtração rápida sem <i>quenching</i>	
	Filtração rápida		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	60% metanol (-40°C)	Resultados idênticos para 60% metanol/70 mM HEPES (pH 5,5) e 60% metanol/0,85% (m/v) carbonato de amónia (pH 5,5).	Faijes <i>et al.</i> , 2007
	60% metanol/70 mM HEPES (pH 5,5), (-40°C)		
	60% metanol/0,85% (m/v) carbonato de amónia (pH 5,5), (-40°C)		
	60% metanol/0,85% (m/v) NaCl, (-40°C)		
<i>Lactococcus lactis</i>	60% metanol (-40°C)	-	Jensen <i>et al.</i> , 1999
<i>Escherichia coli</i>	Azoto líquido	60% metanol a baixas temperaturas com ou sem tampão	Chassagnole <i>et al.</i> , 2002; Maharjan e Ferenci, 2003; Schaefer <i>et al.</i> , 1999; Hiller <i>et al.</i> , 2007; Winder <i>et al.</i> , 2008.
	Ácido perclórico		
	60% metanol com ou sem tampão (-30°C, -40°C e -50°C)		
	Etanol absoluto a quente		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60% metanol com ou sem tampão (-40°C)	60% metanol a -40°C	Koning e van Dam, 1992; Loret <i>et al.</i> , 2007; Buziol <i>et al.</i> , 2002 ; Theobald <i>et al.</i> , 1997
	Ácido perclórico		
	Azoto líquido		

<sup>a</sup> 60% metanol = solução aquosa de metanol

Da revisão da literatura é patente que o processo de *quenching* celular mais adequado na inativação do metabolismo varia de microrganismo para microrganismo, parece mesmo ser microrganismo-dependente. Por exemplo, enquanto para *L. plantarum* uma solução tamponizada de 60% de metanol a -58°C (Faijes *et al.*, 2007)

produz os melhores resultados, já para *S. cerevisiae* a solução de *quenching* mais prometedora foi 60% de metanol em solução aquosa (Koning e van Dam, 1992).

Não foi possível encontrar na literatura qualquer referência a métodos de *quenching* celulares aplicados a *S. pneumoniae*, com excepção de inactivação por mistura com azoto líquido com vista ao isolamento de mRNA. Assim sendo, um dos objectivos deste trabalho consiste em testar diferentes métodos de *quenching* celular em culturas de *S. pneumoniae*, e se possível encontrar as condições adequadas a uma inactivação instantânea do metabolismo para futuros estudos do conteúdo em metabolitos.

### **1.2.3. Extracção de metabolitos intracelulares**

Como referido anteriormente, após o processo de paragem instantânea do metabolismo, os metabolitos intracelulares são extraídos do sedimento celular. O método utilizado deve extrair todos os metabolitos de uma maneira não selectiva e reprodutível, e deve também inibir todas as reacções enzimáticas reversíveis (Faijes *et al.*, 2007; Maharjan e Ferenci, 2003). Não existe actualmente nenhum método de extracção que permita a análise de todos os metabolitos (metaboloma). Assim sendo, o passo de extracção tem por objectivo extrair um número máximo de metabolitos celulares. Quando uma análise compreensiva é necessária, aplicam-se à mesma amostra diferentes procedimentos de extracção. Os métodos de extracção podem ser químicos ou mecânicos (Villas-Bôas *et al.*, 2004). Para extracção de metabolitos intracelulares em microrganismos os métodos mais comuns são os químicos, tais como metanol a frio (Maharjan e Ferenci, 2003), clorofórmio (Jensen *et al.*, 1999), etanol a quente (Visser *et al.*, 2002) e ácido perclórico ou clorídrico (Schaefer *et al.*, 1999). A Tabela 1.2 apresenta um resumo dos métodos de extracção mais comuns aplicados a microrganismos, bem como as suas vantagens e desvantagens. No caso dos ácidos e das bases a grande desvantagem é a degradação dos metabolitos a valores extremos de pH. Em alternativa, usam-se soluções de extracção a pH neutro como o clorofórmio, etanol a quente ou o metanol. No entanto, estes métodos também apresentam desvantagens, tais como a baixa polaridade e solubilidade dos metabolitos em clorofórmio e/ou metanol, ou a instabilidade de determinados metabolitos a temperaturas elevadas (Faijes *et al.*, 2007; Villas-Bôas *et al.*, 2004). A escolha correcta de um método de extracção depende fortemente dos metabolitos de interesse. Idealmente, um método de extracção eficiente deveria ser aplicado para uma



vasta variedade de microrganismos, mas a susceptibilidade de diferentes organismos a condições que causam lise é diferente (Oldiges e Takors, 2005; Faijes *et al.*, 2007).

**Tabela 1.2.** Métodos de extracção de metabolitos aplicados a microrganismos (adaptado de Villas-Bôas *et al.*, 2004)

Método	Vantagens	Desvantagens	Referências
Metanol a frio/ clorofórmio tamponizado	Reprodutível e eficiente A desnaturação de enzimas pelo clorofórmio evita reacções posteriores Boa recuperação para compostos fosforilados	É usado a temperaturas muito baixas (-20 a -40°C) Demorado Toxicidade provocada pelo clorofórmio Dificuldade na automatização	Koning and van Dam, 1992 Jensen <i>et al.</i> , 1999 Maharjan e Ferenci, 2003 Le Belle <i>et al.</i> , 2002
Etanol a quente	Rápido e simples Preciso e fiável Ideal para cultura celulares diluídas Excelente recuperação para certos grupos de compostos (ATP, glucose 6-fosfato, piruvato, NAD <sup>+</sup> e NADH)	Alguns metabolitos não são estáveis a temperaturas altas (ATP, fosfatos de pentoses, 2- oxoglutarato, PEP entre outros)	Gonzalez <i>et al.</i> , 1997 Visser <i>et al.</i> , 2002 Lange <i>et al.</i> , 2001 Maharjan e Ferenci, 2003
Metanol a frio	Todas as vantagens do etanol a quente Não degrada compostos sensíveis à temperatura	A fiabilidade do método é discutível Informação escassa	Maharjan e Ferenci, 2003
Ácido perclórico a frio	Muito usado na extracção de nucleótidos e metabolitos solúveis em água Extracção dos metabolitos em fracções de segundos	Meio muito oxidativo Alguns metabolitos são sensíveis a pH baixo (piruvato, NADH, ATP e alguns fosfomonoésteres) Perda de metabolitos durante o processo	Buchholz <i>et al.</i> , 2002 Lowry <i>et al.</i> , 1971 Maharjan e Ferenci, 2003
Ácido clorídrico a frio	Semelhante ao ácido perclórico	As mesmas desvantagens do ácido perclórico a frio Não forma precipitado, concentração de iões muito elevado, o que pode dificultar análise	Villas-Bôas <i>et al.</i> , 2004
Extracções alcalinas (NaOH)	Muito usado na extracção de nucleótidos e metabolitos solúveis em água	As mesmas desvantagens do ácido perclórico a frio Degrada NAD <sup>+</sup> , entre outros	Maharjan e Ferenci, 2003 Hajjaj <i>et al.</i> , 1998 Buchholz <i>et al.</i> , 2002

A susceptibilidade de *S. pneumoniae* a diferentes métodos de extracção de metabolitos não está descrita na literatura, e é um dos objectivos deste trabalho.

#### 1.2.4. Quantificação de metabolitos

A quantificação de metabolitos intracelulares em grande escala faz-se essencialmente através de duas técnicas analíticas: a espectrometria de massa (MS) e a ressonância magnética nuclear (NMR). O NMR é muito usado na caracterização estrutural de compostos não conhecidos, e tem sido aplicado na análise de metabolitos em fluidos biológicos e extractos celulares (Villas-Bôas *et al.*, 2004). No entanto, este processo analítico tem menor sensibilidade e os custos de equipamento são maiores quando comparados com as técnicas baseadas na espectrometria de massa (Oldiges e Takors., 2005; Villas-Bôas *et al.*, 2004; Neves, 2001). No entanto, o NMR permite mais facilmente a identificação de compostos desconhecidos ou inesperados (Neves *et al.*, 2005). Além disso, o NMR é a única técnica que permite determinar as dinâmicas temporais dos perfis de metabolitos em tempo real e de forma não-invasiva (Neves *et al.*, 2005). A MS apresenta diversas vantagens como por exemplo a grande sensibilidade, possibilidade de confirmar a identidade de determinados compostos presentes numa amostra biológica complexa, custos menos elevados e menor especialização do operador. Adicionalmente, a combinação de técnicas de separação (cromatografia) com a MS (e também com o NMR), expande enormemente a capacidade de análise química de amostras biológicas complexas. As técnicas de separação mais frequentemente acopladas a MS e/ou NMR são a cromatografia de fase gasosa, a cromatografia líquida e a electroforese capilar (Villas-Bôas *et al.*, 2004).

Quando o objectivo é analisar apenas o conteúdo num metabolito em particular, ou num grupo de metabolitos restrito, tais como os metabolitos glicolíticos, é comum recorrer-se a métodos enzimáticos espectrofotométricos. Estes métodos quando aplicados a um número reduzido de metabolitos são mais económicos que a MS ou a NMR, requerem menos especialização por parte do operador, mas são mais morosos. Muitos dos métodos enzimáticos para determinação de metabolitos encontram-se compilados no manual “*Methods of enzymatic analysis*”, como é o caso dos métodos usados neste trabalho para dosear frutose 1,6-bisfosfato, gliceraldeído 3-fosfato, dihidroxiacetona fosfato (Michal, 1988) e 3-fosfoglicerato (Czok, 1988).

O doseamento de produtos de fermentação e substratos utilizados no cultivo de microrganismos (metabolitos extracelulares) faz-se correntemente recorrendo à técnica analítica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Esta técnica baseia-se na separação de diferentes grupos de metabolitos de acordo com tempos de retenção de cada metabolito em face de um determinado tipo de coluna e eluente (Villas-Bôas *et al.*,

2004). Este método é muito usado por ser de fácil uso e aprendizagem; além disso, não está limitado pela volatilidade ou estabilidade dos compostos presentes numa determinada amostra.

### **1.3. Sinopse do trabalho apresentado**

Tal como mencionado, este trabalho teve como objectivos otimizar um método rápido, simples, reprodutível e eficiente de *quenching* celular, bem como um método extracção de metabolitos que se aplicasse ao microrganismo em estudo, *S. pneumoniae*. Usaram-se distintos métodos de quantificação de metabolitos, nomeadamente HPLC para quantificação de metabolitos extracelulares e métodos enzimáticos para quantificação de metabolitos intracelulares. O objectivo geral deste trabalho era contribuir para uma compreensão mais alargada do metabolismo de dois açúcares, a glucose e a galactose, importantes na ecologia de *S. pneumoniae*. Os resultados obtidos serão apresentados e discutidos na secção seguinte, Resultados e discussão.

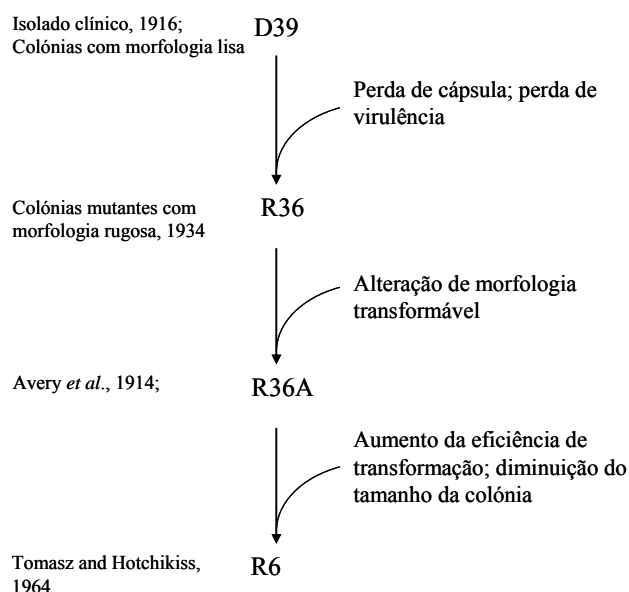
## 2. Materiais e métodos

Informação referente a composição de soluções usadas e protocolos experimentais pode ser consultada no Anexo 1.

### 2.1. Microrganismo e condições de cultura

#### *Microrganismo*

Neste estudo usou-se *Streptococcus pneumoniae* R6, uma estirpe laboratorial não encapsulada e avirulenta de *S. pneumoniae* (Hoskins *et al.*, 2001). A estirpe R6 foi obtida aproximadamente há quarenta anos a partir da estirpe R36A usada por Avery e colaboradores na demonstração do DNA como material genético (Avery *et al.*, 1944). A R36A derivou da estirpe não capsulada R36, que por sua vez teve origem na estirpe encapsulada D39, um isolado clínico e virulento do serótipo 2 (Figura 2.1) (Lanie *et al.*, 2007). *S. pneumoniae* D39 tem sido usada como estirpe modelo no estudo de mecanismos de patogenicidade e virulência por pneumococos, e a sua derivada R6 amplamente usada como um controlo avirulento (Lanie *et al.*, 2007). Devido às suas características, R6 apresenta-se como uma estirpe ideal para optimização de metodologias no estudo de *S. pneumoniae*.



**Figura 2.1.** Representação esquemática da origem da estirpe não encapsulada R6 a partir de uma estirpe virulenta D39. Figura adaptada de Lanie *et al.*, 2007.

### *Preparação de culturas stock*

Células do *stock*-mãe (estirpe R6 proveniente do Departamento de Genética Molecular, Universidade de Groningen, Holanda; células em 20% de glicerol guardadas a -80°C) foram inoculadas (1,25% v/v) em meio complexo M17 (Difco) enriquecido com glucose 0,5% (m/v), a pH inicial 6,5. As culturas foram incubadas a 37°C sem controlo de pH ou atmosfera, em modo estático durante cerca de 7 h (densidade óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) de aproximadamente 1,8). Ao fim deste período de tempo as culturas foram transferidas para tubos de Falcon estéreis e centrifugadas ( $7519 \times g$ , 7 min, 4°C). O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 20 mL de M17, correspondente a metade do volume usado no crescimento. Glicerol foi adicionado para uma concentração final de 25%. Prepararam-se alíquotas de 1 mL (culturas stock) em eppendorfs estéreis e guardaram-se a -80°C.

### *Condições de cultivo*

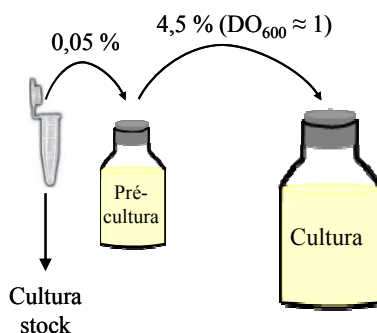
*S. pneumoniae* foi cultivado em frasco, sem controlo de pH ou atmosfera. Para cada crescimento da estirpe R6 preparou-se uma pré-cultura a partir das culturas *stock* como descrito a seguir: 20 µL de cultura stock diluídos em 400 µL de M17 (esta condição foi usada como padrão neste trabalho, salvo algumas exceções descritas nos resultados) foram cultivados em 40 mL de meio quimicamente definido, adaptado de Neves *et al.*, 1999 (CDM, ver Anexo 1), enriquecido com colina a 0,001% (m/v) e piruvato a 0,01% (m/v) em frascos em modo estático. Como fonte de carbono usou-se a glucose ou a galactose a uma concentração final de 1% (m/v). O meio estava a um pH inicial de 6,5. Ao longo do crescimento o pH e a atmosfera não foram controlados. A temperatura de crescimento foi mantida a 37°C.

As culturas foram crescidas a partir das pré-culturas (Figura 2.2) acima mencionadas. Meio CDM (200 mL ou 100 mL) enriquecido com colina a 0,001% (m/v), piruvato a 0,01% (m/v) e fonte de carbono adequada (glucose ou galactose a 1%, m/v) foram inoculados a aproximadamente 4,5% (v/v) com células das pré-culturas recolhidas na fase exponencial tardia do crescimento ( $DO_{600}$  aproximadamente de 1) para uma  $OD_{600}$  inicial de 0,04-0,05. As condições de crescimento da cultura no que respeita a atmosfera, pH e fonte de carbono foram idênticas às descritas para a pré-cultura respectiva.

O crescimento de pré-culturas e culturas foi avaliado pela leitura da turbidez a 600 nm num espectrofotómetro (Shimadzu UV-1601), sendo as leituras de turbidez feitas

contra água. Para evitar saturação e obter leituras correctas, a partir de  $DO_{600}$  0,6 efectuaram-se diluições da cultura inicial em água.

As taxas específicas de crescimento ( $\mu$ ) foram calculadas através de regressões lineares dos valores de  $\ln(DO_{600})$  versus o tempo, durante a fase exponencial de crescimento.



**Figura 2.2.** Representação esquemática da transferência de células da pré-cultura para a cultura.

## 2.2. Comparação de métodos de *quenching* celular

Os métodos de *quenching* celular usados nesta tese foram baseados nos procedimentos descritos por Faijes *et al.*, 2007 (para maior detalhe ver Anexo 1). O conteúdo intracelular em frutose 1,6-bisfosfato (FBP, metabolito de referência) em células submetidas aos diferentes métodos de *quenching* celular foi analisado após extracção metanólica. As culturas foram crescidas em CDM enriquecido com glucose (1% m/v).

### *Métodos de quenching celular*

Três tipos de soluções de *quenching* foram usadas e comparadas: 60% metanol/0,85% carbonato de amónia (pH 5,5) a  $-40^{\circ}\text{C}$ , metanol absoluto a  $-20^{\circ}\text{C}$ , e 60% (v/v) metanol a  $-40^{\circ}\text{C}$ . Para efectuar o *quenching* celular, transferiram-se rapidamente (com seringa) 50 mL de cultura na fase exponencial tardia do crescimento ( $DO_{600}$  de aproximadamente 1,1) para tubos de centrifuga contendo 150 mL de cada solução a  $-40^{\circ}\text{C}$  (60% (v/v) metanol/ 0,85% (m/v) carbonato de amónio ou 60% metanol) em banho de azoto líquido ou 150 mL de metanol absoluto a  $-20^{\circ}\text{C}$  em banho de gelo. As misturas foram imediatamente centrifugadas ( $7519 \times g$ , 7 min,  $2^{\circ}\text{C}$ ). Recolheram-se os sobrenadantes e guardaram-se a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise de perdas durante o processo de *quenching* celular. Os sedimentos foram submetidos a extracção metanólica.

### *Extracção metanólica*

Os sedimentos foram ressuspensos em 10 mL de metanol absoluto a -80°C e em seguida centrifugados ( $39191 \times g$ , 7 min, 2°C). Os sobrenadantes foram transferidos para balões de liofilização e os sedimentos lavados e centrifugados ( $39191 \times g$ , 5 min, 2°C) duas vezes com 5 mL de metanol absoluto a -80°C e duas vezes com 5 mL de água destilada a 4°C. Os sobrenadantes das diferentes lavagens foram combinados com o respectivo sobrenadante original (no balão de liofilização) e a mistura concentrada num rotavapor por evaporação do solvente orgânico. Posteriormente as amostras foram liofilizadas, dissolvidas num volume mínimo de água destilada e o pH ajustado a 6,5. Estas amostras foram guardadas a -20°C para posterior análise. Durante todo o procedimento, a temperatura das amostras foi mantida abaixo de 4°C.

#### **2.2.1. Teste de degradação de frutose 1,6-bisfosfato**

A frutose 1,6-bisfosfato foi usada neste trabalho como metabolito de referência para comparação de métodos de *quenching* celular e extracção. Em trabalhos anteriores, estudou-se a estabilidade da FBP quando submetida aos processos de extracção perclórica (Neves, 2001) e etanólica a quente (resultados não publicados) e verificou-se que em ambos os casos a recuperação em FBP era próxima de 100%, *i.e.*, não ocorreu degradação. Mostrou-se também, usando uma técnica de ressonância magnética nuclear (NMR) *in vivo* que a FBP é o metabolito que se acumula em maior quantidade (Carvalho *et al.*, 2008). Neste trabalho estudou-se a estabilidade da FBP quando submetida ao processo de extracção metanólica e após exposição a uma solução de *quenching* celular (avaliação da degradação de FBP que se possa ter perdido para o ambiente extracelular durante o passo de *quenching* celular).

#### *Exposição de FBP a solução de quenching celular*

Preparam-se duas soluções aferidas de 1 mM e 5 mM de FBP em sobrenadante de uma cultura de células na fase exponencial tardia do crescimento ( $DO_{600}$  de aproximadamente 1,0). A 5 mL de solução (1 mM ou 5 mM de FBP em sobrenadante de cultura) adicionou-se 15 mL de 60% metanol a -40°C (solução de *quenching* celular) e incubou-se em gelo durante 15 min.

*Exposição de FBP ao processo de extracção metanólica*

Preparam-se duas soluções aferidas de FBP a 1 mM e a 5 mM em água destilada. A 5 mL de cada solução adicionaram-se 10 mL de metanol absoluto a -80°C e 5 mL de água a 4°C (ver processo de extracção); as misturas incubaram-se em gelo durante 1h30m.

Em ambos os testes, após os tempos de incubação referidos, as amostras foram concentradas no rotavapor e liofilizadas. O liofilizado foi ressuspensionado num volume mínimo de água e o pH ajustado a 6,5. As amostras guardaram-se a -20°C para posterior análise. Durante todo o procedimento, a temperatura das amostras foi mantida abaixo de 4°C.

**2.3. Comparação de métodos para extracção de metabolitos**

Neste trabalho testaram-se três métodos de extracção previamente descritos por Faijes *et al.*, 2007, em amostras não submetidas ao processo de *quenching*. Recolheram-se 50 mL de células, crescidas em CDM enriquecido com glucose (1% m/v) em fase exponencial tardia do crescimento ( $DO_{600}$  de aproximadamente de 1,0). As células foram imediatamente centrifugadas ( $7519 \times g$ , 7 min, 2°C). Os sedimentos foram submetidos aos processos de extracção.

*Extracção metanólica (descrito em 2.2)*

O sedimento celular foi ressuspensionado em 10 mL de metanol absoluto a -80°C e imediatamente centrifugado ( $39191 \times g$ , 7min, 2°C). O sobrenadante foi transferido para um balão de liofilização e o sedimento lavado e centrifugado ( $39191 \times g$ , 5min, 2°C) duas vezes com 5 mL de metanol absoluto a -80°C e duas vezes com 5 mL de água destilada a 4°C. Os sobrenadantes das diferentes lavagens foram combinados com o sobrenadante original e a mistura concentrada num rotavapor e liofilizada. O liofilizado foi dissolvido num volume mínimo de água destilada e o pH ajustado a 6,5. Estas amostras foram guardadas a -20°C para posterior análise. Durante todos os procedimentos, a temperatura das amostras foi mantida abaixo de 4°C.

*Extracção etanólica a quente*

O sedimento celular foi ressuspensionado em 3 mL de água destilada e transferido para um balão de liofilização. Os metabolitos foram extraídos com etanol a 80% (v/v), com agitação, num banho a 90°C com um condensador de refluxo durante 10 min. Depois de



arrefecida, a suspensão foi centrifugada ( $39191 \times g$ , 10 min, 4°C). O sedimento foi ressuspensionado em etanol a 80% (v/v) e sujeito a mais uma extracção nas condições descritas anteriormente. Os sobrenadantes resultantes das duas extracções foram combinados e o etanol evaporado num rotavapor. A amostra resultante foi liofilizada. O liofilizado foi dissolvido num volume mínimo de água destilada e o pH ajustado a 6,5. A amostra resultante guardou-se a -20°C para posterior análise.

#### *Extracção perclórica*

O sedimento celular foi ressuspensionado em 10 mL de MOPS 2,5 mM (pH 7,0, 4°C) e transferido para 1,2 mL de uma solução de ácido perclórico 6 M, para uma concentração final de 0,6 M. A suspensão celular foi colocada num banho de gelo, com agitação, durante 20 min. O extracto foi neutralizado pela adição de KOH 5 M e centrifugado ( $39191 \times g$ , 40 min, 4°C). O sobrenadante foi recolhido e liofilizado. A amostra resultante foi dissolvida num volume mínimo de água destilada e o pH ajustado a 6,5. Guardou-se a -20°C para posterior análise.

#### **2.3.1. Teste de eficiência/qualidade do método de *quenching* celular**

De forma a testar a eficiência/qualidade do *quenching*, compararam-se três métodos de extracção em amostras submetidas ao processo de *quenching* celular: 50 mL de cultura em fase exponencial tardia do crescimento ( $DO_{600}$  de aproximadamente 1) foram transferidos rapidamente para tubos de centrifuga com 150 mL de 60% metanol a -40°C e imediatamente centrifugados ( $7519 \times g$ , 7 min, 2°C). Os sedimentos foram submetidos aos métodos de extracção metanólica, etanólica a quente e perclórica, tal como descritos em 2.3.

#### **2.3.2. Comparação da extracção perclórica conjugada ou não com o *quenching* celular em amostras de uma mesma cultura**

Para testar a eficiência do processo de extracção perclórica com ou sem *quenching* submeteram-se amostras celulares obtidas a partir de uma única cultura a i) *quenching* celular com 60% metanol a -40°C seguido de extracção perclórica, ii) extracção perclórica tradicional (separação do meio de cultura por centrifugação), e iii) extracção perclórica directa (sem separação do meio de cultura). Em todos os processos, usaram-se 50 mL de cultura em CDM com glucose 1% (m/v) recolhida em fase exponencial

tardia do crescimento. Durante todo o procedimento, a temperatura das amostras foi mantida abaixo de 4°C.

#### *Quenching celular seguido de extracção perclórica*

A cultura (50 mL) foi rapidamente transferida para um tubo de centrifuga contendo 150 mL de 60% metanol a -40°C e a mistura processada tal como descrito em 2.2. Após centrifugação, o sedimento celular foi ressuspensionado em 10 mL de MOPS 2,5 mM (pH 7,0, 4°C), e os metabolitos extraídos com ácido perclórico a 0,6 M tal como descrito em 2.3 (extracção perclórica). A amostra foi guardada a -20°C para posterior análise.

#### *Extracção perclórica*

A cultura (50 mL) foi centrifugada ( $7519 \times g$ , 7 min, 4°C) e o sobrenadante descartado. O sedimento celular foi rapidamente ressuspensionado em 10 mL de MOPS 2,5 mM (pH 7,0, 4°C), a 4°C, e os metabolitos extraídos com ácido perclórico a 0,6 M tal como descrito em 2.3 (extracção perclórica). A amostra foi guardada a -20°C para posterior análise.

#### *Extracção perclórica directa*

A 50 mL de cultura foram rapidamente adicionados 5,6 mL de uma solução de ácido perclórico 6 M a 4°C para uma concentração final 0,6 M. A suspensão celular foi colocada num banho de gelo durante 20 min, com agitação. Após este período o extracto foi neutralizado pela adição de KOH 5 M e centrifugado ( $39191 \times g$ , 40 min, 4°C). O sobrenadante foi recolhido e liofilizado. O liofilizado foi dissolvido num volume mínimo de água destilada (pH 6,5) e a amostra guardada a -20°C para posterior análise.

### **2.4. Conteúdos intracelulares durante o crescimento em glucose ou galactose**

Para análise de conteúdos intracelulares durante o crescimento fizeram-se extracções perclóricas directas (ver 2.3.2). Foram recolhidos 50 mL de células crescidas em meio CDM enriquecido com glucose 1% (m/v) ou galactose 1% (m/v) em três fases distintas do crescimento: exponencial ( $DO_{600}$  de aproximadamente 0,26), exponencial tardia ( $DO_{600}$  de aproximadamente 0,9) e estacionária ( $DO_{600}$  de aproximadamente 1,5). Adicionou-se rapidamente às culturas 5,6 mL de uma solução de ácido perclórico 6 M

(4°C) para uma concentração final 0,6 M, colocaram-se as suspensões num banho de gelo, com agitação durante 20 min. Após este período o extracto foi neutralizado pela adição de KOH 5 M e centrifugado ( $39191 \times g$ , 40 min, 4°C). O sobrenadante foi recolhido e liofilizado. A amostra foi dissolvida num volume mínimo de água destilada e o pH ajustado a 6,5. As amostras guardaram-se a -20°C para posterior análise.

## 2.5. Quantificação de metabolitos intracelulares por métodos enzimáticos

A quantificação dos metabolitos intracelulares 3-fosfoglicerato (3-PGA), frutose 1,6-bisfosfato (FBP), dihidroxiacetona fosfato (DHAP) e gliceraldeído 3-fosfato (GAP) nos extractos celulares obtidos em 2.4 baseou-se em medições espectrofotométricas da oxidação de NADH a 340 nm à temperatura ambiente (Anexo 1).

Os metabolitos DHAP, GAP e FBP foram quantificados pelo método descrito por Michal (Michal, 1988). A mistura reaccional inicial (volume total 1,5 mL) continha tampão TEA 200 mM (pH 7,6), EDTA 20 mM, amostra (50% v/v), e NADH 0,17 mM. Leu-se o valor inicial de absorvência ( $A1$ ). Adicionou-se desidrogenase do glicerol 3-fosfato (0,2 U), incubou-se 7 min (tempo de reacção) e leu-se a absorvência ( $A2$ ). Adicionou-se isomerase de fosfo-trioses (1,3 U), incubou-se 5 min (tempo de reacção) e leu-se a absorvência ( $A3$ ). Por fim, adicionou-se aldolase (0,07 U), incubou-se 9 min (tempo de reacção) e leu-se a absorvência ( $A4$ ). As concentrações de DHAP, GAP e FBP foram calculadas aplicando a Fórmula 2.1, em que  $\Delta A$  corresponde às diferenças de absorvência  $A1 - A2$ ,  $A2 - A3$ , e  $A3 - A4$ , respectivamente, e considerando o coeficiente de extinção molar do NADH a 340 nm de 6,3 L/mmol/cm.

$$C = \frac{V \times \Delta A}{\epsilon \times d \times v}$$

**Fórmula 2.1.** C, concentração; V, volume total;  $\Delta A$ , diferença de absorvência,  $\epsilon$  coeficiente de extinção molar; d, largura da célula; v, volume de amostra.

O metabolito 3-PGA foi quantificado pelo método enzimático tal como descrito por Czok (Czok, 1988). A mistura reaccional inicial (volume 1,1 mL) continha tampão TEA 100 mM (pH 7,6), EDTA 1mM, amostra (50% v/v), NADH 0,1 mM,  $MgSO_4$  8 mM, ATP 7 mM, desidrogenase do gliceraldeído 3-fosfato (3,2 U), isomerase de fosfo-trioses (24 U) e desidrogenase do glicerol 3-fosfato (0,8 U). Incubou-se 15 min e leu-se a absorvência aos 15 min ( $A1$ ). Adicionou-se a cinase do fosfo-glicerato (18 U), incubou-se 25 min e leu-se a absorvência ( $A2$ ). A concentração de 3-PGA foi calculada

aplicando a Fórmula 2.1, em que  $\Delta A$  corresponde às diferenças de absorvência  $A_1 - A_2$ , e considerando o coeficiente de extinção molar do NADH a 340 nm de 6,3 L/mmol/cm.

A conversão de concentração determinada no extracto para concentração intracelular foi efectuada, considerando um volume intracelular para *S. pneumoniae* de 2,9  $\mu\text{L}/\text{mg}$  de proteína (volume intracelular adaptado do organismo *Lactococcus lactis* como mencionado por Poolman *et al.*, 1987) e a relação entre proteína e  $\text{DO}_{600}$  (proteína = 0,21  $\text{DO}_{600}$ ).

## 2.6. Quantificação de produtos de fermentação

A estirpe R6 foi cultivada em CDM contendo 1% (m/v) de glucose ou galactose a 37°C com um pH inicial de 6,5. Amostras das culturas (2 mL) foram retiradas em diferentes fases do crescimento, centrifugadas ( $21076 \times g$ , 3 min, 4°C) e os sobrenadantes guardados a -20°C para posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os substratos e os produtos de fermentação foram determinados por HPLC, usando uma coluna de troca iónica, HPX-87H (Bio-Rad Laboratories Inc., Califórnia, USA) a 60°C,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (5 mM) como eluente, e com um fluxo de 0,5 mL/min. Os produtos de fermentação e os substratos foram identificados de acordo os seus tempos de retenção.

Em alternativa, os produtos de fermentação foram quantificados na solução sobrenadante por  $^1\text{H}$ -NMR num espectrómetro Bruker DRX300 usando uma sonda de detecção inversa com 5 mm de diâmetro de cavidade tal como descrito por Neves *et al.*, 1999. Uma solução de ácido fórmico foi usada como padrão interno de concentração.

## 2.7. Medição de actividades enzimáticas

Os cultivos foram efectuados em meio CDM enriquecido com glucose ou galactose 1% (m/v) até à fase exponencial do crescimento ( $\text{DO}_{600}$  de aproximadamente 0,28). Centrifugaram-se 40 mL de cultura ( $7741 \times g$ , 7 min, 4°C), o sobrenadante foi descartado, e o sedimento lavado com 10 mL de tampão  $\text{KP}_i$  50 mM, pH 7,2 e novamente centrifugado. O sedimento resultante foi ressuspensionado em 3 mL de tampão  $\text{KP}_i$  50 mM, pH 7,2. As suspensões celulares foram guardadas em aliquotas de 1 mL a -20°C.

Os extractos celulares foram obtidos por ruptura mecânica das suspensões celulares usando um Mini-Bead-Beater-8™. Resumidamente, as suspensões celulares foram submetidas a dois ciclos de 1 min cada, e, entre estes, mantidas em gelo durante 1 min. Os fragmentos celulares foram removidos por centrifugação ( $21076 \times g$ , 30 min, 4°C). Os extractos foram preparados imediatamente antes das medições de actividade enzimática, que foram realizadas num espectrofotómetro Beckman DU70, equipado com um porta células termostaticado. Todas as medições foram efectuadas a 37°C. As actividades de desidrogenase do lactato (LDH) e de cinase do piruvato (PK) foram quantificadas pelo consumo de NADH monitorizado pela evolução da absorvência a 340 nm, num volume total de 1 mL, como descrito por Garrigues *et al.*, 1997. Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalizar a conversão de 1  $\mu$ mole de substrato por minuto nas condições experimentais utilizadas.

#### *Desidrogenase do lactato*

A mistura reaccional continha tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7.2),  $MgCl_2$  5 mM, NADH 0,3 mM, FBP 3 mM, extracto celular (aproximadamente 0,02 mg); a reacção foi iniciada pela adição do substrato piruvato de sódio 20 mM.

#### *Cinase do piruvato*

A mistura reaccional continha tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7.2),  $MnSO_4$  5 mM, KCl 10 mM, ADP 1 mM, NADH 0,3 mM, LDH 10 U, glucose 6-fosfato (G6P) 3 mM, extracto celular (aproximadamente 0.02 mg); a reacção foi iniciada pela adição do substrato fosfoenolpiruvato (PEP) 2 mM.

A oxidação não específica do NADH foi determinada em misturas reacionais idênticas às descritas para LDH e PK, excepto na adição de substrato que foi substituído por um volume equivalente de água destilada. A proteína total nos extractos foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), como descrito em 2.8.

## **2.8. Determinação da concentração de proteína**

### *Doseamento de proteína em extractos celulares*

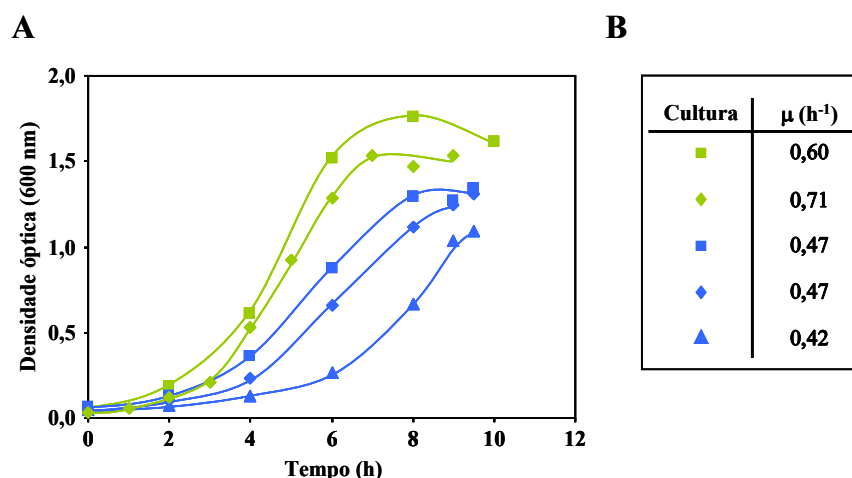
A proteína em extractos celulares usados para quantificação de actividades enzimáticas foi doseada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A preparação dos extractos

celulares encontra-se descrita em 2.7. A 50 uL de extracto celular adicionou-se 2,5 mL de reagente de Bradford (feito no laboratório). As misturas foram homogeneizadas e incubadas à temperatura ambiente, durante 10 min. A absorvência foi lida a 595 nm. A quantidade de proteína foi calculada, tendo por base uma relação padrão, determinada em condições semelhantes e para a qual se usou como padrão a albumina de soro bovino.

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Optimização das condições de crescimento de pré-culturas e culturas

Os estudos efectuados ao longo deste trabalho requereram o cultivo de *S. pneumoniae* R6 em meio CDM, enriquecido com colina e piruvato, e usando como fonte de carbono glucose ou galactose. Para tal, este microrganismo foi previamente adaptado às condições de cultura seleccionadas durante a noite (pré-culturas) e subsequentemente transferido para meio de cultura fresco (culturas) e cultivado tal como descrito na secção de materiais e métodos. No entanto, inicialmente não foi possível obter crescimentos reprodutíveis de R6. Culturas crescidas a partir de pré-culturas preparadas nas mesmas condições e/ou com  $DO_{600}$  finais semelhantes ( $\approx 1.0$ ), apresentaram diferenças drásticas quer ao nível dos perfis e taxas de crescimento, bem como ao nível da quantidade de biomassa final (Figura 3.1). Inclusive, muitas vezes as culturas nem sequer arrancavam (dados não apresentados).

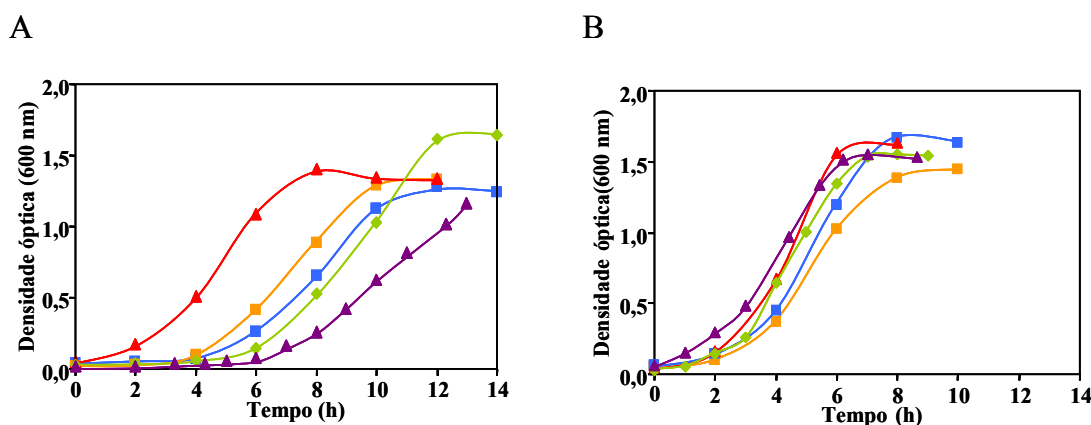


**Figura 3.1.** Perfis (A) e respectivas taxas de crescimento de culturas (B) de *S. pneumoniae* R6 em 40 mL de CDM. Os símbolos a verde representam duas culturas independentes de R6 inoculadas a partir de pré-culturas preparadas com 5  $\mu$ L de stock mais 495  $\mu$ L de M17 com uma  $DO$  final de 1,053 (■) e 1,152 (◆). A azul apresentam-se os perfis de crescimento de três culturas de R6 inoculadas a partir de pré-culturas preparadas com 20  $\mu$ L de stock mais 480  $\mu$ L de M17, e cuja  $DO_{600}$  final era 0,922 (■), 1,032 (◆) e 0,920 (▲).

Foram feitas algumas tentativas no sentido de ajustar as condições de pré-cultura (volumes de stock, tempo de incubação) mas sem grande sucesso. Nesta fase e apesar de se terem usado pré-culturas com  $DO_{600}$  finais semelhantes, questionou-se se as células estariam sempre na mesma fase de crescimento. Dados preliminares obtidos no nosso

grupo, mostravam uma acentuada lise celular da estirpe R6 após atingir a  $DO_{600}$  máxima. Assim sendo, eventuais variações no crescimento durante a noite poderiam originar pré-culturas com a mesma  $DO_{600}$  final mas em fases de crescimento bastante distintas. Logo, tornou-se imperativo fazer uma optimização das condições de pré-cultura de forma a ter células em fase exponencial, num tempo útil durante a noite, e que originassem culturas reprodutíveis.

Na Figura 3.2.A. apresentam-se os perfis de crescimento de pré-culturas (40 mL de CDM) de *S. pneumoniae* R6 em meio CDM enriquecido com 0,01% (m/v) de piruvato e 0,001% (m/v) de colina e usando como fonte de carbono 1% (m/v) de glucose.



**Figura 3.2.** Curvas de crescimento de pré-culturas em 40 mL de CDM (A) e de culturas em 100 mL de CDM (B) de *S. pneumoniae* R6. As culturas foram preparadas a partir de pré-culturas (4,5% v/v) cultivadas em condições idênticas às apresentadas em A. Símbolos: (▲), 500 µL de stock; (■), 25 µL de stock mais 475 µL de M17 (■), 10 µL de stock mais 490 µL de M17; (◆) 5 µL de stock mais 495 µL de M17; (▲) 20 µL de stock mais 400 µL de M17. A estirpe foi crescida em meio CDM enriquecido com 0,01% (m/v) de piruvato e 0,001% (m/v) de colina e usando como fonte de carbono 1% (m/v) de glucose, sob condições de pH e atmosfera não controladas. O crescimento foi seguido através da leitura da turbidez a 600 nm em intervalos de 2 horas, com a excepção da condição de 20 µL diluídos em 400 µL de M17 que foi em intervalos de 1 hora. Estão representadas curvas de crescimento tipo onde o erro de cada ponto para as pré-culturas é  $\leq 40\%$  e para as culturas é  $\leq 18\%$ .

Para escolher a melhor condição de pré-cultura, foram efectuados cultivos distintos com quantidades de cultura stock que variaram entre 5 e 500 µL. No caso das pré-culturas inoculadas com quantidades de cultura stock inferiores a 500 µL, diluiu-se a cultura stock em M17 ou CDM para um volume final de 500 µL (esta mistura denominou-se inóculo da pré-cultura), de modo a manter o volume de inoculação constante. Para a apresentação dos resultados, escolheram-se crescimentos



representativos de cada condição. Tal como esperado, a diminuição da quantidade de cultura stock causou um aumento da fase de latência das pré-culturas. Esta tendência manteve-se independentemente da quantidade de M17 no inóculo variar ou ser constante (resultados não apresentados). No entanto, a fase de latência foi maior em pré-culturas onde a quantidade de M17 no inóculo foi menor, tal como exemplificado pelos perfis de crescimento das pré-culturas inoculadas com 25  $\mu\text{L}$  de stock mais 475  $\mu\text{L}$  M17 (quadrados laranja) e 20  $\mu\text{L}$  de stock mais 400  $\mu\text{L}$  de M17 (triângulos roxos) (Figura 3.2.A). Curiosamente, pré-culturas iniciadas com cultura stock diluída em CDM não cresceram (resultados não apresentados). Desta forma podemos concluir que a adição de M17 nos inóculos de pré-culturas potencia o crescimento de *S. pneumoniae*.

Posteriormente, avaliou-se também o efeito das condições de pré-cultura no perfil de crescimento de culturas da estirpe R6. Para tal, seguiu-se o crescimento de culturas preparadas a partir de pré-culturas inoculadas com quantidades de stock idênticas às testadas anteriormente e cultivadas até uma  $\text{DO}_{600}$  de 1 (fase exponencial tardia). A análise dos resultados revela um ligeiro efeito das condições de pré-cultura nos perfis de crescimento de culturas (Figura 3.2.B). Apesar de haver alguma variação nas taxas de crescimento, a biomassa final foi sempre bastante semelhante para todas as condições testadas (Figura 3.2.B e Tabela 3.1). Comparativamente, em relação às diferenças observadas inicialmente no cultivo do microrganismo pode-se dizer que após este estudo sistemático das condições de pré-cultura e cultura é agora possível cultivar *S. pneumoniae* R6 de uma forma muito mais reprodutível.

**Tabela 3.1.** Taxas específicas de crescimento ( $\mu$ ) de culturas de *S. pneumoniae* R6 preparadas a partir de pré-culturas (4,5% v/v) inoculadas com diferentes quantidades de stock. Os valores apresentados são médias de taxas de crescimento  $\pm$  desvio padrão, correspondentes a crescimentos independentes, excepto para a cultura preparada a partir de uma pré-cultura inoculada com 500  $\mu\text{L}$  de stock.

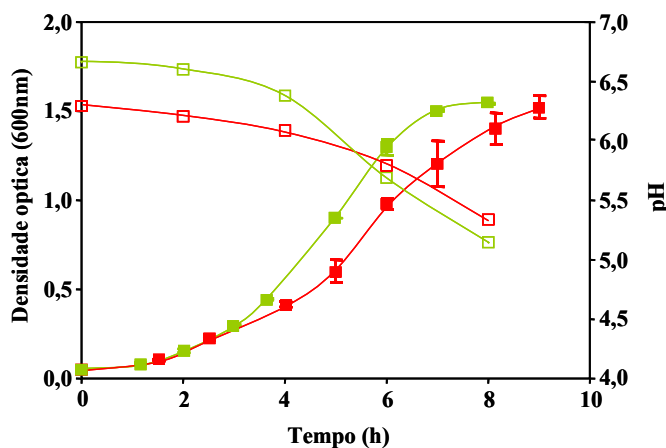
	Inóculo de pré-cultura				
	500 $\mu\text{L}$ de stock	25 $\mu\text{L}$ de stock + 475 $\mu\text{L}$ de M17	10 $\mu\text{L}$ de stock + 490 $\mu\text{L}$ de M17	5 $\mu\text{L}$ de stock + 495 $\mu\text{L}$ de M17	20 $\mu\text{L}$ de stock + 400 $\mu\text{L}$ de M17
$\mu$ (1/h)	0,67	0,55 $\pm$ 0,03	0,48 $\pm$ 0,03	0,69 $\pm$ 0,06	0,73 $\pm$ 0,08

Com base nos resultados acima apresentados, seleccionou-se como condição para preparação de pré-cultura a adição de 20  $\mu\text{L}$  de stock diluídos em 400  $\mu\text{L}$  de M17 a 40 mL de CDM, visto esta condição permitir obter células em fases exponencial de

crescimento ao fim de 12 horas de cultivo. Esta condição foi ideal para o tipo de estudos efectuados ao longo deste trabalho, tornando possível o pré-cultivo da estirpe R6 durante a noite e o crescimento de culturas durante o dia para a realização das experiências.

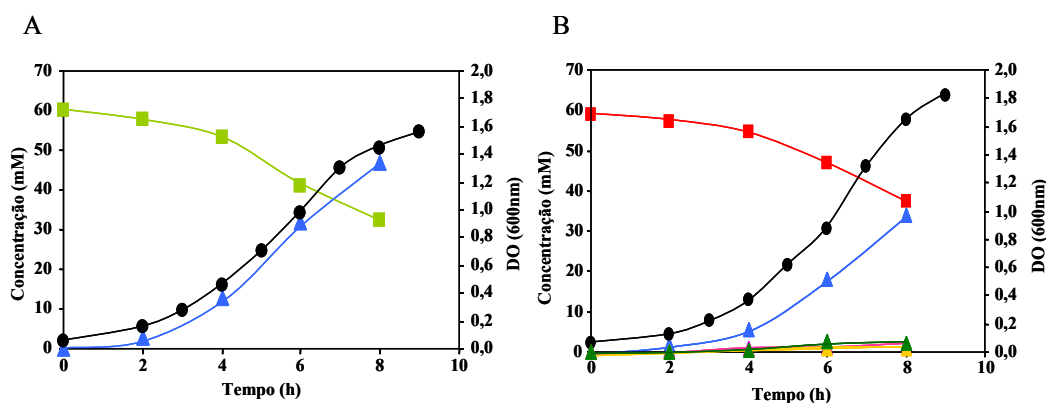
### 3.2. Caracterização do crescimento de *S. pneumoniae* R6 em glucose e galactose

As características de crescimento de *S. pneumoniae* R6 em glucose e galactose foram avaliadas em culturas crescidas em meio CDM com 1% (m/v) de açúcar, enriquecido com piruvato e colina, sob condições de pH e atmosfera não controlados, num ambiente microaerofílico. Na Figura 3.3 apresentam-se os perfis de crescimento e variação do pH extracelular, de culturas da estirpe R6 cultivadas em glucose e galactose. Nas condições de cultura testadas, *S. pneumoniae* R6 cresceu mais rapidamente em glucose do que em galactose. A taxa específica de crescimento de culturas em glucose ( $0,57 \pm 0,04$  1/h) foi 1,3 vezes superior à de culturas em galactose ( $0,43 \pm 0,03$  1/h) (Tabela 3.3). Em ambos os açúcares observou-se um decréscimo do pH extracelular ao longo do crescimento. No entanto, esta variação foi mais acentuada em glucose ( $1,5 \pm 0,00$  unidades de pH) do que em galactose ( $1,0 \pm 0,03$  unidades de pH) (Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Perfil de crescimento e variação do pH extracelular de culturas da estirpe R6 em glucose e galactose. Símbolos: (■), biomassa em glucose; (□), variação do pH extracelular em glucose; (■), biomassa em galactose; (□), variação do pH extracelular em galactose. A estirpe foi crescida em glucose ou galactose 1% (m/v), em meio CDM enriquecido com piruvato a 0,01% (m/v) e colina 0,001% (m/v) sob condições de pH e atmosfera não controlados. O crescimento foi seguido através da leitura da turbidez a 600 nm. A variação de pH extracelular foi avaliada em amostras de culturas recolhidas de 2 em 2 horas usando um eléctrodo de pH externo. As barras de erro representam o erro associados às médias para os dois crescimentos independentes. As linhas são interpolações simples. O valor P entre as duas condições de crescimento é de 0,0283.

O consumo de substrato bem como a cinética de formação dos produtos finais de fermentação em culturas de *S. pneumoniae* R6 em glucose e galactose são apresentadas na Figura 3.4. Em ambos os casos, o açúcar não foi totalmente consumido; da glucose inicial cerca de 45% foi usada enquanto apenas 35% da galactose foi consumida pela estirpe R6. O lactato ( $46,6 \pm 0,3$  mM) foi o único produto resultante do metabolismo da glucose (Figura 3.4.A). No entanto, do consumo da galactose resultaram para além do lactato ( $32,8 \pm 1,3$  mM), pequenas quantidades de formato ( $2,2$  mM  $\pm 0,1$  mM), acetato ( $1,7 \pm 0,0$  mM) e etanol ( $0,8 \pm 0,2$  mM) (Figura 3.4.B). Em termos de rendimentos em produtos finais, verifica-se que a produção de lactato é superior em glucose do que em galactose (Tabela 3.2). Este facto explica o maior decréscimo do pH extracelular observado em culturas de *S. pneumoniae* R6 cultivadas em glucose.



**Figura 3.4.** Crescimento, formação dos produtos finais e consumo de glucose (A) e galactose (B) na estirpe R6. Símbolos (■), glucose; (■), galactose; (▲), lactato; (◆), acetato; (▲), etanol; (▲), formato; (●), biomassa. Células crescidas em dois açúcares a 1% (m/v) enriquecidos com piruvato a 0,01% (m/v) e colina 0,001% (m/v) sob condições de pH e atmosfera não controlados. Representação de uma experiência tipo. As linhas são interpolações simples. O valor P para o lactato quando comparado entre as duas condições de crescimento é de 0,0042.

**Tabela 3.2.** Rendimento em produtos finais do metabolismo da glucose e da galactose por *S. pneumoniae* R6, crescida em meio CDM enriquecido com piruvato e colina, sob condições de pH não controlado e atmosfera microaerofílica. ND – não detectado.

Substrato	Rendimento em produtos finais (mol de produto / mol de substrato consumido)			
	Lactato	Acetato	Formato	Etanol
Glucose	$1,71 \pm 0,05$	ND	ND	ND
Galactose	$1,56 \pm 0,03$	$0,08 \pm 0,00$	$0,11 \pm 0,00$	$0,03 \pm 0,00$

Na Tabela 3.3 apresenta-se uma comparação dos parâmetros de crescimento e bioenergéticos para *S. pneumoniae* R6 cultivada em glucose e galactose. As recuperações em carbono e o balanço redox foram semelhantes em ambos os açúcares. A velocidade de consumo de glucose foi superior à de galactose, estando de acordo com as taxas de crescimento observadas. No entanto, os rendimentos em biomassa e ATP foram superiores em células crescidas em galactose.

**Tabela 3.3.** Balanços de carbono e de redox, taxa específica de crescimento e parâmetros energéticos obtidos a partir *S. pneumoniae* R6 cultivada em glucose e galactose. Valores de experiências representativas para cada açúcar.

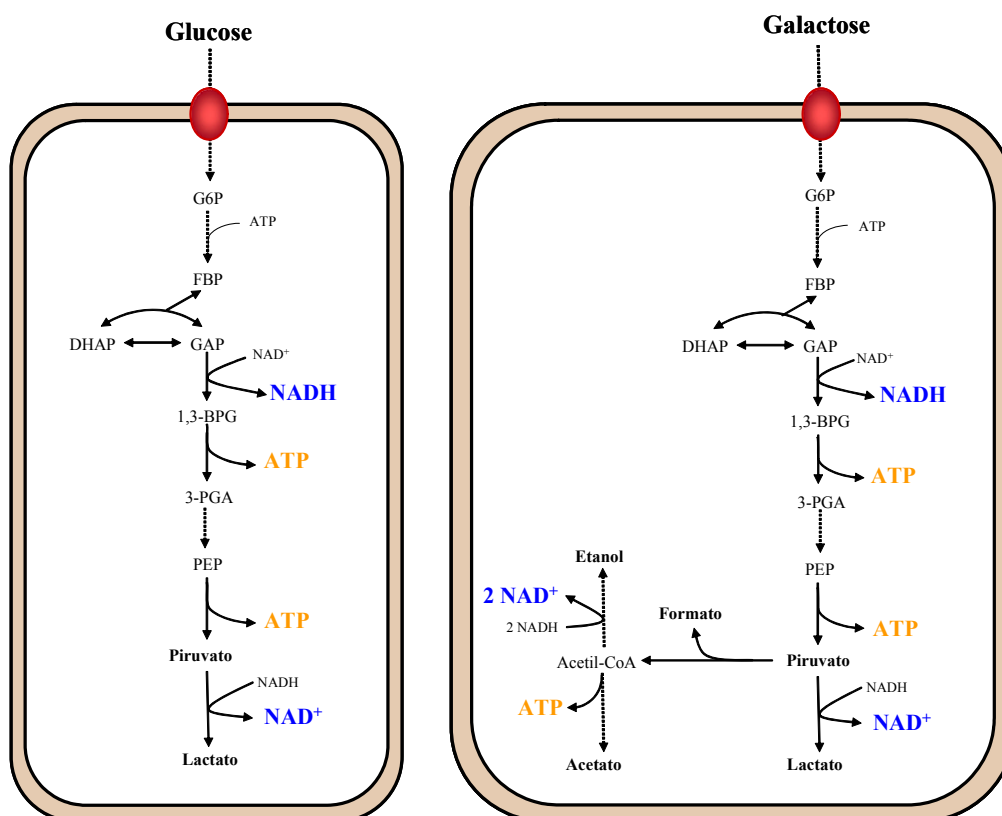
Substrato	Glucose	Galactose
<b>Balanço de Carbono<sup>a</sup> (%)</b>	85 ± 3	84 ± 1
<b>Balanço Redox<sup>b</sup> (%)</b>	85 ± 3	82 ± 1
<b>μ<sup>c</sup> (1/h)</b>	0,57 ± 0,04	0,43 ± 0,03
<b>Rendimento de biomassa (g / mol de substrato)</b>	20,2 ± 2,3	27,8 ± 0,1
<b>Rendimento de ATP (mol / mol de substrato)</b>	1,71 ± 0,05	1,76 ± 0,02
<b>Y<sub>ATP</sub> (g biomassa / mol ATP)</b>	11,8 ± 1,0	16,2 ± 0,3
<b>q<sub>s</sub><sup>max</sup> (mmol / g / h)</b>	14,9 ± 0,4	12,2 ± 0,7

<sup>a</sup>O balanço de carbono representa a percentagem de substrato que é recuperada em produtos de fermentação (lactato, acetato e etanol); <sup>b</sup>O balanço redox é a razão entre [lactato] + 2 x [etanol] e 2 x [substrato consumido] multiplicada por 100; <sup>c</sup>taxa específica de crescimento calculada por regressão linear.

Os resultados obtidos mostram que na presença de glucose *S. pneumoniae* R6 apresenta um perfil de fermentação homoláctico, enquanto que a utilização de galactose causa um desvio para uma fermentação de ácidos mistos, com formação de acetato, etanol, formato e lactato. A alteração do perfil metabólico homolático para a produção de ácidos mistos na presença de galactose no organismo modelo *Lactococcus lactis* está bem documentada (Thomas *et al.*, 1980; Garrigues *et al.*, 1997; Even *et al.*, 2001). Tanto neste organismo como em espécies distintas de *Streptococcus* verificou-se um aumento do nível da liase do piruvato-formato em células crescidas em galactose, quando comparada com células crescidas em glucose (Abbe *et al.*, 1982; Yamada *et al.*, 1985; Melchiorson *et al.*, 2000). Sob condições microaerofílicas ou anaeróbicas, a PFL converte piruvato a formato e acetil-CoA, que é posteriormente metabolizado por acção das enzimas fosfotranscetilase e cinase do acetato ou desidrogenases do aldeído e do álcool, a acetato ou etanol, respectivamente (Figura 3.5) (Zhu *et al.*, 2004; Abbe *et al.*,

1982). Mais recentemente, Yesilkaya *et al.* (2009) identificaram o gene que codifica a PFL em *S. pneumoniae* D39 e mostraram que a sua expressão era também maior em células crescidas em galactose do que em glucose. Tal como nos organismos referidos anteriormente ou na sua estirpe mãe D39, o metabolismo da galactose parece induzir a PFL em *S. pneumoniae* R6, facto que se traduz na produção de formato. Os resultados aqui obtidos estão de acordo com a observação anterior de que o re-direccionamento do fluxo de carbono para a produção de ácidos mistos em *S. pneumoniae* é mediado pela actividade da PFL (Yesilkaya *et al.*, 2009).

Enquanto a produção de etanol a partir de acetil-CoA regenera duas moléculas de  $\text{NAD}^+$ , a formação de acetato origina uma molécula adicional de ATP (Figura 3.5). Assim sendo, não é de estranhar o aumento de biomassa em galactose dada a maior quantidade de energia disponível para o crescimento. Consequentemente, o rendimento em biomassa relativo ao ATP ( $Y_{\text{ATP}}$ ), em gramas de biomassa por mole de ATP, foi superior em galactose quando comparado com glucose (Tabela 3.3).



**Figura 3.5.** Representação esquemática do metabolismo da glucose e da galactose em *S. pneumoniae* R6. Abreviaturas: G6P, glucose 6-fosfato; FBP, frutose 1,6-bisfosfato; GAP, gliceraldeído 3-fosfato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; 1,3-BPG 1,3-bisfosfoglicerato; 3-PGA, 3-fosfoglicerato; PEP, fosfoenolpiruvato.

Em várias bactérias Gram-positivas, a glucose é apontada como substrato preferencial (Monod, 1942; Saier *et al.*, 1996; Poncet *et al.*, 2004). Os resultados obtidos ao longo deste trabalho confirmam a existência desta preferência também em *S. pneumoniae*, dado que as taxas específicas de crescimento ( $\mu$ ) e de velocidade de consumo de substrato ( $q_s^{\max}$ ) foram maiores em glucose do que em galactose (Tabela 3.3).

### 3.3. Efeito do açúcar nas actividades enzimáticas da desidrogenase do lactato (LDH) e da cinase do piruvato (PK) de *S. pneumoniae* R6

A LDH é uma enzima chave no metabolismo de açúcares em bactérias do ácido láctico, que cataliza a redução de piruvato a lactato com a concomitante oxidação de NADH. Por outro lado, a PK é a última enzima da via de Embden-Meyerhof-Parnas, que converte o fosfoenolpiruvato (PEP) em piruvato com a produção simultânea de ATP. As actividades enzimáticas destas duas enzimas foram medidas em extractos celulares de culturas em fase exponencial, crescidas em glucose ou galactose nas condições acima mencionadas (Tabela 3.4). A actividade da PK foi semelhante em células crescidas em glucose ou galactose. No entanto, verificou-se que a actividade da LDH era cerca de oito vezes superior em células crescidas em glucose.

**Tabela 3.4.** Actividades enzimáticas de PK e LDH determinadas em extractos celulares de *S. pneumoniae* R6 crescida em glucose ou galactose. As actividades estão expressas em U/mg proteína. Todas as medições foram feitas no mínimo em duplicado em dois extractos obtidos de culturas independentes.

	Glucose	Galactose
<b>PK</b>	2,65 ± 0,06	2,54 ± 0,07
<b>LDH</b>	1,92 ± 0,012	0,23 ± 0,02

Um importante mecanismo de regulação genética em bactérias é a repressão catabólica por açúcares (RCA), também conhecida como utilização hierárquica e coordenada de açúcares. Em bactérias Gram-positivas, a RCA é mediada pela CcpA (proteína A de controlo catabólico) (Warner *et al.*, 2003; Titgemeyer *et al.*, 2002). Adicionalmente, sabe-se também que a CcpA está envolvida na activação da expressão de genes que codificam para enzimas envolvidas na glicólise do organismo modelo *L.*

*lactis*. Em particular, observou-se uma redução da expressão dos genes codificantes para a PK (*pyk*) e LDH (*ldh*) em resposta à inactivação da CcpA em *L. lactis* (Luesink *et al.*, 1998; Zomer *et al.*, 2007). No entanto, os níveis de expressão destas enzimas foram maiores em células crescidas em glucose do que em células crescidas em galactose (Luesink *et al.*, 1998). Em *S. pneumoniae* verificou-se recentemente que a LDH é regulada positivamente pela CcpA (Iyer *et al.*, 2005). Esta observação está de acordo com dados de transcriptómica de *S. pneumoniae* no nosso grupo de investigação, que mostram que a CcpA exerce um controlo positivo na expressão do gene *ldh* em glucose e galactose, sendo o seu nível de expressão superior no primeiro açúcar (Carvalho *et al.*, manuscrito em preparação; Carvalho *et al.*, 2009). Ao contrário do que acontece em *L. lactis*, os genes *ldh* e *pyk* não se encontram no mesmo operão sendo transcritos independentemente (Wegmann *et al.*, 2007; Lanie *et al.*, 2007) Por este motivo, não é surpreendente que a expressão destes genes esteja submetida a mecanismos de regulação distintos. Tendo em conta as observações acima referidas sobre a regulação da LDH, parece que a menor actividade desta enzima medida em células de *S. pneumoniae* R6 crescidas em galactose se deve a uma menor expressão do gene *ldh*. Por outro lado e apesar de não termos dados que confirmem este facto, a expressão da PK parece ser constitutiva em *S. pneumoniae*.

### 3.4. Determinação de conteúdos em metabolitos intracelulares

#### 3.4.1. Estudo comparativo de métodos de *quenching* celular e de extracção de metabolitos aplicados a *S. pneumoniae*

O metaboloma de um microrganismo resulta da amplificação e integração de sinais dos diferentes níveis de organização celular (genoma funcional, transcriptoma, proteoma), fornecendo portanto informação sobre os processos biológicos que estão activos sob determinadas condições de crescimento. Assim, as amostras usadas para a análise de metabolitos *in vitro* devem reflectir o estado biológico de interesse, requerendo que a velocidade de paragem do metabolismo seja superior às taxas das reacções metabólicas (Faijes *et al.*, 2007). A paragem instantânea do metabolismo denomina-se *quenching* celular. Quando é necessária uma separação entre metabolitos intracelulares e extracelulares, é essencial que o processo *quenching* celular não afecte a integridade das células. Vários procedimentos de *quenching* celular têm sido testados em bactérias

Gram-positivas como *Lactobacillus plantarum* e *Corynebacterium glutamicum* (Faijes *et al.*, 2007; Wittman *et al.*, 2004). No entanto, que se saiba, não existe documentada informação sobre o efeito deste tipo de procedimentos em *S. pneumoniae*. Neste trabalho investigaram-se três métodos de *quenching* celular previamente usados para paragem instantânea do metabolismo em organismos Gram-positivos, com o objectivo de analisar o que melhor se aplica a *S. pneumoniae*. Após o passo de *quenching* celular, os metabolitos intracelulares precisam de ser extraídos do sedimento celular. Assim, testaram-se também três procedimentos diferentes de extracção de metabolitos intracelulares em *S. pneumoniae*.

Todas as culturas celulares usadas foram crescidas em meio CDM enriquecido com 0,01% (m/v) de piruvato e 0,001% (m/v) de colina e usando como fonte de carbono 1% (m/v) de glucose ou galactose, sob condições de pH e atmosfera não controladas. Dado que o nosso laboratório não está equipado com dispositivos de amostragem automática, a recolha de amostras foi feita manualmente com uma seringa com capacidade para 50 mL. Apesar deste método não permitir a recolha de amostras tão rapidamente como os dispositivos automáticos (ver introdução), tentou-se que este primeiro passo fosse o mais sistemático possível de forma a parar o metabolismo no mais curto espaço de tempo possível.

Para comparação da eficiência dos métodos de *quenching* celular e de extracção de metabolitos, escolheu-se a frutose 1,6-bisfosfato (FBP) como metabolito de referência (representante dos metabolitos intracelulares) pelas seguintes razões: (i) no nosso laboratório verificou-se, usando uma técnica de ressonância magnética nuclear (NMR) *in vivo* aplicada ao estudo do metabolismo da glucose, que a FBP é o metabolito que se acumula em maior quantidade (Carvalho *et al.*, 2008), e (ii) diversos estudos apontaram para a sua grande estabilidade quando exposta a condições como baixo pH ou solventes inorgânicos (Neves, 2001). Na análise dos metabolitos intracelulares efectuada no estudo comparativo de extracção e do metabolismo de *S. pneumoniae* em dois açúcares diferentes, foram também quantificados a DHAP, o GAP e o 3-PGA.

É de realçar que os estudos aqui apresentados, ainda que originais, são apenas preliminares.



### 3.4.2. Estudo comparativo do método de *quenching* celular

Neste estudo usaram-se três soluções de *quenching* celular à base de metanol frio: 60% (v/v) de metanol a -40°C, 60% (v/v) de metanol / 0,85% (m/v) de carbonato de amónia a -40°C e metanol absoluto a -20°C. A selecção do método de *quenching* celular mais eficiente foi feita apenas com base na capacidade das diferentes soluções em manterem a integridade celular, medida pela perda de FBP para o meio durante o passo de *quenching* celular.

As amostras foram recolhidas de culturas de *S. pneumoniae* em glucose na fase exponencial tardia de crescimento e imediatamente transferidas para a solução de *quenching* numa razão de 1:3 (v/v). Após centrifugação e lavagem com a mesma solução de *quenching* para remoção de eventuais restos de metabolitos extracelulares, o sedimento celular foi extraído com metanol -80°C, tal como descrito na secção de Materiais e métodos, e a quantidade de FBP no extracto medida por método enzimático. Os sobrenadantes das duas centrifugações, passo de *quenching* e lavagem, foram combinados e a solução resultante denominou-se sobrenadante total. Por forma a avaliar quantitativamente a lise celular provocada pelo procedimento de *quenching* celular, a quantidade de FBP foi medida no sobrenadante total.

Na Tabela 3.5 apresentam-se os valores de concentração intracelular de FBP determinados a partir de extractos celulares, bem como a percentagem de perda deste metabolito provocada pelas diferentes soluções de *quenching* celular. De entre os três procedimentos, o metanol absoluto a -20°C parece ser o que causa uma maior perda de FBP. Cerca de 68% da FBP total foi determinada no sobrenadante após o *quenching* das amostras e lavagem do sedimento celular com metanol absoluto a -20°C. As perdas causadas por 60% (v/v) de metanol a -40 °C e 60% (v/v) de metanol / 0.85% de carbonato de amónia a -40 °C foram semelhantes (aproximadamente 40%). Por conseguinte, a concentração intracelular de FBP determinada em extractos celulares foi semelhante em células submetidas a estes dois últimos procedimentos de *quenching* celular, mas mais elevada do que em células tratadas com metanol absoluto a -20°C. Assim sendo, as soluções de 60% (v/v) de metanol e 60% (v/v) de metanol / 0,85% de carbonato de amónia pareciam produzir resultados semelhantes quando utilizadas para inactivar o metabolismo de *S. pneumoniae*. Antevendo uma possível interferência causada por iões noutros métodos de quantificação de metabolitos (por exemplo: NMR), seleccionou-se o procedimento de *quenching* celular com 60% (v/v) de metanol a -40°C.

**Tabela 3.5.** Quantificação da FBP em extractos celulares e sobrenadantes totais (% de perda) obtidos após tratamento de suspensões celulares com as diferentes soluções de quenching celular. Os procedimentos de *quenching* foram feitos em triplicado e o valor de cada metabolito é a média de duas medições.

Método	Amostra	Metabolito (mM)	% de perda		Notas
		FBP	FBP	DO <sub>600</sub> (cultura)	
60% Metanol -40°C	A <sub>1</sub>	1,4 ± 0,1	41,9 ± 3,5	0,972	As absorvências (340nm) determinadas nas amostras de extractos (5x diluído) apresentavam valores médios de 1,3; nos sobrenadantes totais apresentavam valores de 2,5. Os primeiros são incolores, enquanto que os últimos apresentavam uma cor de laranja forte.
	A <sub>2</sub>	2,5 ± 0,0	23,2 ± 3,5	1,16	
	A <sub>3</sub>	1,2 ± 0,1	40,7 ± 7,9	1,1	
	M	1,7 ± 0,7	35,3 ± 10,5		
Metanol absoluto -20°C	A <sub>1</sub>	0,6 ± 0,1	VN	1	As absorvências (340nm) determinadas nas amostras de extractos (5x diluído) apresentavam valores médios de 1,3; nos sobrenadantes totais apresentavam valores de 2,8. Os primeiros são incolores, enquanto que os últimos apresentavam uma cor de laranja forte.
	A <sub>2</sub>	0,3 ± 0,0	67,3 ± 11,5	1,12	
	A <sub>3</sub>	0,2 ± 0,0	69,0 ± 6,2	1,02	
	M	0,4 ± 0,2	68,15 ± 1,2		
60% Metanol/ 0,85% Carbonato de amónia -40°C (pH 5,5)	A <sub>1</sub>	1,4 ± 0,1	VN	0,944	As absorvências (340nm) determinadas nas amostras de extractos (5x diluído) apresentavam valores médios de 1,3; nos sobrenadantes totais apresentavam valores de 2,5. Os primeiros são incolores, enquanto que os últimos apresentavam uma cor de laranja forte.
	A <sub>2</sub>	0,9 ± 0,1	42,3 ± 9,3	1,104	
	A <sub>3</sub>	1,3 ± 0,0	48,8 ± 21,5	1,076	
	M	1,2 ± 0,3	45,55 ± 4,5		

VN, valor negativo; A, Amostra, M, média das três amostras separadas.

### 3.4.3. Estudo de degradação de FBP pelo processo de *quenching* celular

Estudos anteriores realizados neste laboratório mostraram que a FBP encontra-se em concentrações elevadas (na ordem dos 8-10 mM) em pneumococos (Carvalho *et al.*, 2008), e que apresenta grande estabilidade quando submetida a algumas soluções de extracção (Neves, 2001). Curiosamente, as concentrações de FBP apresentadas na Tabela 3.5 são inferiores às determinadas usando uma técnica não-invasiva, a ressonância magnética nuclear *in vivo* (Carvalho *et al.*, 2008). Este resultado levou-nos a questionar se a FBP seria estável nas condições usadas neste trabalho. Assim, foi testada a estabilidade da FBP quando submetida ao processo de extracção metanólica e ao processo de *quenching* celular (avaliação da degradação de FBP que se possa ter

perdido para o ambiente extracelular durante o passo de *quenching* celular). A solução de *quenching* usada foi a escolhida em 3.4.2, 60% de metanol a  $-40^{\circ}\text{C}$ . Os valores de concentração intracelular de FBP nos dois processos encontram-se apresentados na Tabela 3.6. Para ambos os processos com uma concentração de FBP de 1 mM, verificou-se que a percentagem de degradação foi inferior a cerca de 10%. Para uma concentração de 5 mM, a FBP quando exposta ao processo de *quenching* apresenta uma taxa de degradação inferior a 10%, ao passo que, na exposição ao processo de extracção apresenta uma taxa de cerca de 40%. Em suma, a FBP quando submetida aos processos de *quenching* ou extracção metanólica apresenta uma recuperação acima dos 90% (na generalidade dos casos, a excepção dever-se-á confirmar com repetição da análise) o que significa que é estável, e que os métodos utilizados não resultam na sua degradação. Este resultado levou-nos a supor que a diferença nas concentrações intracelulares de FBP entre o estudo aqui apresentado e os dados obtidos por NMR *in vivo* (Carvalho *et al.*, 2008) se devem a outras condições experimentais, tais como condições de cultivo.

**Tabela 3.6.** Quantificação da FBP para análise da sua estabilidade quando exposta ao processo de extracção metanólica e ao processo de *quenching* celular

	FBP (mM)	
	1 mM	5 mM
Exposição de FBP a solução de <i>quenching</i> celular	$0,9 \pm 0,0$	$4,8 \pm 0,3$
Exposição de FBP ao processo de extracção metanólica	$1,0 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,1$

#### 3.4.4. Estudo comparativo dos métodos de extracção de metabolitos

Tal como os procedimentos de *quenching* celular, os métodos de extracção mais adequados a *S. pneumoniae* ainda não eram conhecidos quando se iniciou este trabalho. Neste trabalho compararam-se três procedimentos de extracção em amostras não submetidas a *quenching* celular. Para tal, recolheram-se células na fase exponencial tardia de crescimento que, após centrifugação para eliminar o meio de cultura, foram submetidas a extracção perclórica, metanólica ou etanólica. A eficiência de extracção dos diferentes métodos foi determinada através da quantificação dos níveis de FBP, DHAP e GAP (Tabela 3.7). A quantidade de FBP determinada foi semelhante nos três tipos de extractos. No entanto, as quantidades de DHAP e GAP medidas foram muito

baixas, estando nalguns casos abaixo do limite de detecção do ensaio. Dos métodos testados, a extracção perclórica parece ser a mais satisfatória, dado que nestas amostras se conseguiram medir os três metabolitos.

**Tabela 3.7.** Concentrações intracelulares de FBP, DHAP e GAP em células de *S. pneumoniae* R6, extraídas de sedimento celular com diferentes métodos. As medições foram feitas em duplicado para cada método de extracção. VN – valor negativo

Método	Metabolitos (mM)			Notas
	FBP	DHAP	GAP	
<b>Extracção Perclórica</b>	4,2 ± 0,3	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,0	Os valores de absorvência (340nm) variavam entre o 1 e 1,1 com diluições de 5x da amostra original. Os extractos apresentavam uma coloração leitosa semi-transparente.
<b>Extracção Metanólica</b>	5,2 ± 0,1	VN	0,0 ± 0,7	Os valores de absorvência (340nm) eram de aproximadamente 1,2 com diluições de 5x da amostra original. Os extractos apresentavam uma coloração leitosa e opaca.
<b>Extracção Etanólica</b>	4,2 ± 0,1	VN	VN	Os valores de absorvência (340nm) eram de aproximadamente 1,4 com diluições de 5x da amostra original. Os extractos apresentavam uma coloração leitosa e opaca.

De forma a testar a eficiência da solução de *quenching*, seleccionada em 3.4.2, na paragem do metabolismo celular, compararam-se os três métodos de extracção em amostras submetidas a *quenching* celular com 60% de metanol a -40°C (Tabela 3.8). Ao contrário das observações anteriores, foi possível quantificar a FBP, a DHAP e o GAP nos três tipos de extractos, após o *quenching* celular. Nestas condições experimentais, parece que todas as extracções são igualmente eficazes. No entanto, a quantidade de FBP determinada foi 3-4 vezes inferior à concentração medida em extractos cujas células não foram tratadas com a solução de *quenching* (comparar Tabelas 3.7 e 3.8). De facto, as concentrações de FBP medidas em extractos de células não submetidas à solução de *quenching* (4-5 mM) aproxima-se mais dos valores determinados por Carvalho *et al.*, (2008) e que estão na ordem dos 8-10 mM. Assim, a diferença observada nos níveis de FBP entre extractos de células submetidos ou não ao processo de *quenching* deve-se muito provavelmente a perdas causadas pela solução de 60% de metanol a -40°C, tal como observado no ponto 3.4.2. Contudo, os valores elevados de absorvência inicial (2,5 a 2,8), muito acima do limite de detecção do espectrofotómetro, medidos nos sobrenadantes totais aquando da comparação dos diferentes procedimentos

de *quenching* celular (ponto 3.4.2), indicam que os resultados relativos às percentagens de perda possam estar adulterados. É possível que a variação de absorvência esteja mascarada pela cor forte dos sobrenadantes totais, e logo o valor de perda calculado não corresponda de todo à realidade, sendo neste caso um valor por defeito. Estes dados podem indicar que a quantidade de FBP perdida no passo de *quenching* celular seja superior aos 40% estimados no ponto 3.4.2.

**Tabela 3.8.** Concentrações intracelulares de FBP, DHAP e GAP em células de *S. pneumoniae* R6 extraídas com diferentes métodos, após *quenching* celular com 60% de metanol a  $-40^{\circ}\text{C}$ . As medições foram feitas em duplicado para cada metabolito em três extractos independentes obtidos com o mesmo método.

Método	Metabolitos (mM)			Notas
	FBP	DHAP	GAP	
<b>Extracção Perclórica</b>	$1,2 \pm 0,4$	$1,7 \pm 0,5$	$0,75 \pm 0,2$	Os valores de absorvência (340nm) variavam entre o 1 e 1,1. Os extractos apresentavam uma coloração leitosa e transparente.
<b>Extracção Metanólica</b>	$1,3 \pm 1,4$	$2,65 \pm 0,7$	$1,05 \pm 0,07$	Os valores de absorvência (340nm) eram de aproximadamente 1,3-1,4 com diluições de 5x da amostra original. Os extractos apresentavam uma coloração leitosa e quase opaca.
<b>Extracção Etanólica</b>	$1,4 \pm 0,0$	$1,4 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,0$	Os valores de absorvência (340nm) eram de aproximadamente 1,4-1,6 com diluições de 5x da amostra original. Os extractos apresentavam uma coloração leitosa e opaca.

### 3.4.5. Estudo comparativo da extracção perclórica conjugada ou não com *quenching* celular em amostras de uma mesma cultura de *S. pneumoniae* R6

Considerando que os resultados anteriores foram obtidos em células de culturas independentes, achamos interessante comparar a eficiência de extracção com ou sem *quenching* celular em amostras derivadas da mesma cultura de *S. pneumoniae* R6. Para este estudo seleccionou-se o método de extracção perclórico dado que parecia ser o mais eficaz em 3.4.4. A eficiência de extracção foi avaliada em amostras submetidas a *quenching* celular com 60% de metanol a  $-40^{\circ}\text{C}$ , em células recolhidas por centrifugação sem *quenching* celular e directamente por mistura da solução perclórica com células em meio de cultura (extracção perclórica directa).

*S. pneumoniae* R6 foi cultivado em meio com glucose até à fase exponencial tardia do crescimento e recolheram-se três amostras, uma foi imediatamente transferida para a solução de *quenching*, outra foi centrifugada para eliminar o meio de cultura e a terceira foi transferida directamente para o ácido perclórico. A eficiência de extracção nas três condições foi determinada através da quantificação dos níveis de FBP, DHAP e GAP (Tabela 3.9). Os níveis de metabolitos intracelulares medidos em extractos perclóricos obtidos directamente da cultura ou de sedimento celular foram semelhantes, no entanto, a concentração de FBP determinada foi cerca de 3 vezes inferior em amostras extraídas directamente com ácido perclórico. A medição dos metabolitos intracelulares nestas condições foi repetida várias vezes mas obtiveram-se sempre os mesmos resultados. Comparativamente à extracção sem inactivação do metabolismo, verificou-se que as quantidades de FBP, DHAP e GAP eram significativamente mais baixas em amostras submetidas a *quenching* celular. Esta observação está de acordo com os dados obtidos anteriormente neste trabalho e revelam que as perdas originadas pelo *quenching* podem rondar os 70-90%.

**Tabela 3.9.** Quantificações de FBP, DHAP e GAP em células de *S. pneumoniae* R6 recolhidas em três condições distintas e extraídas com ácido perclórico. As medições foram feitas em duplicado para cada metabolito em pelo menos dois extractos representativos de cada condição.

Método	Metabolitos (mM)		
	FBP	DHAP	GAP
<i>Quenching</i> metanol 60% -40°C Extracção Perclórica	0,7 ± 0,14	0,85 ± 0,5	0,15 ± 0,07
Extracção Perclórica directa	2,15 ± 0,9	3,0 ± 0,9	1,9 ± 0,9
Extracção Perclórica	6,6 ± 1,4	2,85 ± 1,9	1,35 ± 1,3

Diversos estudos reportados na literatura demonstraram que o método mais adequado de *quenching* celular depende fortemente do organismo em estudo. No caso de *S. pneumoniae*, os três métodos testados, todos baseados na utilização de soluções metanólicas a baixas temperaturas, resultaram em lise celular e perda de conteúdos intracelulares (pelo menos 40% da FBP perdia-se durante o processo de *quenching*, mas este valor pode ser bem mais elevado). Estes resultados estão de acordo com outros publicados para bactérias Gram-positivas. De facto, Wittman e colaboradores

investigaram diferentes procedimentos de *quenching* envolvendo soluções de metanol em *C. glutamicum* (Wittman *et al.*, 2004). Estes autores concluíram que todos os métodos afectavam a integridade celular, resultando em perda de metabolitos e, logo não eram adequados para quantificação de conteúdos intracelulares em *C. glutamicum*. Por outro lado, soluções a -40°C de 60% metanol em 70 mM de HEPES a pH 5.5 (v/v) ou em 0,85% carbonato de amónia a pH 5,5 (v/v) não só mantiveram a integridade celular como pararam instantaneamente o metabolismo de *L. plantarum* (Faijes *et al.*, 2007). Já em *S. cerevisiae*, uma solução aquosa de metanol é eficiente na paragem imediata do metabolismo sem causar lise celular, e a adição de um tampão não parecer ter um efeito benéfico adicional (Winder *et al.*, 2008). Independentemente do organismo ou do processo de *quenching* celular a que este é submetido, a perda de metabolitos devido a lise ocorre com grande frequência (Winder *et al.*, 2008; Jensen *et al.*, 1999; Villas-Bôas *et al.*, 2004; Wellerdiek *et al.*, 2008). O estudo aqui apresentado vem substantiar a ideia de que o processo de *quenching* celular mais adequado depende em grande parte do organismo em estudo. No caso de *S. pneumoniae*, será necessário testar outras condições no sentido de encontrar aquela que menos afecta a integridade celular.

#### **3.4.6. Comparação dos níveis de metabolitos de *S. pneumoniae* R6 cultivado em glucose e galactose**

Culturas de *S. pneumoniae* crescidas em glucose e galactose apresentaram perfis de crescimento e produtos finais distintos devido à indução de vias metabólicas diferentes, nomeadamente, a inibição da LDH no metabolismo de galactose (ponto 3.2). Os re-direccionamentos dos fluxos metabólicos são em parte dependentes das variações que ocorrem nos metabolitos intracelulares e sabe-se que os seus níveis variam ao longo do crescimento.

Neste estudo compararam-se os níveis de FBP, DHAP, GAP e 3-PGA em três fases de crescimento (exponencial, exponencial tardia e estacionária) em culturas de *S. pneumoniae* R6 crescidas em glucose e galactose (Tabela 3.10). Estes metabolitos foram escolhidos porque sabe-se estarem envolvidos na regulação do desvio metabólico a fermentação de ácidos mistos em *L. lactis* (Neves *et al.*, 2005). Dado os problemas mencionados acima com a aplicação de soluções metabólicas no processo de *quenching* celular, optou-se por um método que combina o processo de *quenching* com o de extracção num só passo, e que consistiu na mistura rápida de uma solução fria de ácido perclórico com uma amostra de cultura celular (ver ponto 3.4.5., extracção perclórica

directa). Em glucose, verificou-se uma redução de 2-4 vezes no nível de todos os metabolitos quando se passa de fase exponencial para fase exponencial tardia, mas não se registaram grandes variações desta para a fase estacionária. Em galactose os conteúdos intracelulares em FBP, DHAP e GAP diminuem de fase exponencial para exponencial tardia e desta para fase estacionária. Curiosamente, não se detectou acumulação de 3-PGA em qualquer fase de crescimento em galactose. Independentemente da fase de crescimento, a concentração de FBP foi inferior às concentrações de DHAP e GAP tanto em células crescidas em glucose como em galactose. Contudo, para alguns metabolitos o erro associado variou praticamente entre 0 e 100%. Assim sendo, a incerteza nos resultados é enorme impedindo qualquer tipo de argumentação que justifiquem as observações acima mencionadas. Com base em resultados publicados para outros organismos da mesma família (Streptococcaceae), e em particular *L. lactis* (Jensen *et al.*, 1999) em que a concentração intracelular de FBP em fase exponencial era 2- e 20- vezes superior às de DHAP e GAP, respectivamente, pôs-se em questão a validade dos nossos dados experimentais.

**Tabela 3.10.** Quantificações da FBP, DHAP, GAP e 3-PGA em células de *S. pneumoniae* cultivadas em glucose e galactose. Para cada metabolito, as quantificações foram feitas em duplicados e para cada fase do crescimento, o método de extracção foi feito em duplicado. Utilizou-se o método de extracção perclórica directa.

Fase de crescimento	Glucose				Galactose			
	FBP	DHAP	GAP	3-PGA	FBP	DHAP	GAP	3-PGA
Exponencial	8,2 ± 4,7	16 ± 1	17 ± 10,2	5,9 ± 0,4	6,2 ± 1,1	16 ± 1,7	14 ± 12	ND
Exponencial tardia	2 ± 0,7	3,8 ± 0,6	4,5 ± 1,6	2,9 ± 0,0	3 ± 1,2	9,5 ± 7,7	11 ± 10	ND
Estacionária	1,9 ± 0,1	4,8 ± 0,7	2,3 ± 0,2	2,9 ± 0,0	0,9 ± 0,6	2,2 ± 0,7	2,9 ± 0,5	ND

Uma análise mais cuidada dos dados, nomeadamente dos dados brutos de absorvência (valores acima de 2,5 a 340 nm) levou-nos a suspeitar de um efeito de saturação durante a determinação de absorvências no método de quantificação, o que veio de facto a comprovar-se com a repetição de algumas amostras em condições não saturantes (Tabela 3.11). Infelizmente, devido a limitações de tempo não foi possível voltar a analisar todas as amostras obtidas. É curioso observar que a concentração de FBP em extractos diluídos cinco vezes (absorvência inicial cerca de 1,1) obtidos em



fase exponencial, é agora da mesma ordem de grandeza que a concentração de DHAP e GAP. Neste ponto, é de salientar que estudos anteriores no nosso laboratório apontavam para medições por excesso do nível deste metabolito pelo método utilizado quando comprado com NMR quantitativo. Assim, sendo não nos é possível tirar conclusões sobre os níveis de metabolitos medidos neste trabalho.

**Tabela 3.11.** Quantificações da FBP, DHAP, GAP em duas fases distintas do crescimento de *S. pneumoniae* cultivado em glucose. As quantificações dos diferentes metabolitos foram feitas em duplicados. As absorvências iniciais apresentavam valores superiores a 2,5 em amostras sem diluição e cerca de 1,1 em amostras diluídas 5 vezes. Utilizou-se o método de extracção perclórica directa.

Saturação do espectrofotómetro	Exponencial			Exponencial tardia		
	FBP	DHAP	GAP	FBP	DHAP	GAP
Amostras não diluídas, saturação	4,8 ± 0,1	16,6 ± 3,5	9,4 ± 1,1	2,35 ± 0,5	3,3 ± 0,4	2,3 ± 0,3
Amostra diluída 5x, sem saturação	16,0 ± 2,0	18,0 ± 1,2	22,4 ± 1,3	5,5 ± 0,1	4,8 ± 0,1	0,2 ± 0

## 4. Considerações Finais

Neste trabalho, fez-se um estudo comparativo do metabolismo de glucose e galactose numa estirpe de *Streptococcus pneumoniae* não virulenta, R6. Em resumo, foi efectuada uma caracterização do crescimento no que refere a taxas de crescimento, rendimentos de consumo de substrato e formação de produtos, e parâmetros bioenergéticos. Determinaram-se duas actividades enzimáticas chave, uma da via glicólítica (cinase do piruvato) e outra do metabolismo do piruvato (desidrogenase do lactato). Por último tentou-se quantificar metabolitos intracelulares em três fases distintas do crescimento de pneumococos em glucose ou galactose (exponencial, exponencial tardia e estacionária).

*S. pneumoniae* tem a capacidade de utilizar glucose ou galactose como fontes únicas de energia, mas a glucose permite taxas de crescimento mais elevadas. Enquanto que o metabolismo da glucose é tipicamente homoláctico, a galactose induz um desvio metabólico a uma fermentação de ácidos mistos (produção de formato, acetato e etanol além de lactato). Este padrão foi parcialmente explicado pela diminuição da actividade de desidrogenase do lactato, em células crescidas em galactose. Os resultados aqui apresentados indicam fortemente que durante o crescimento em glucose ou galactose os mecanismos de regulação em efectivo são diferentes.

Até à data são poucos os estudos que abordaram o efeito de diferentes açúcares no metabolismo e virulência de *S. pneumoniae*. Não foi possível encontrar na literatura qualquer referência a métodos de *quenching* celular aplicados a estudos metabólicos em pneumococos. Posto isto, grande parte do trabalho aqui apresentado foi desenvolvido no sentido de testar processos de *quenching* celular e/ou extracção de metabolitos intracelulares e aplicá-los na caracterização do metabolismo de açúcares em *S. pneumoniae*. Concluímos que as três soluções metanólicas testadas no procedimento de *quenching* do metabolismo afectaram a integridade celular resultando em perdas significativas de metabolitos. Em relação ao método de extracção, a utilização de uma solução de ácido perclórico a frio foi nas nossas mãos a que produziu melhores resultados. Visto as soluções de *quenching* celular testadas terem-se afigurado não adequadas para *S. pneumoniae* prosseguimos o nosso trabalho no sentido de determinar conteúdos intracelulares recorrendo a um método que combina o processo de *quenching*

com o de extracção num só passo, e que consistiu na mistura rápida de uma solução fria de ácido perclórico com uma amostra de cultura celular. Este método foi aplicado a amostras obtidas em diferentes fases do crescimento de *S. pneumoniae* cultivado em glucose ou galactose. Tentou quantificar-se nos extractos resultantes três metabolitos glicolíticos que se sabem estar envolvidos na regulação do desvio metabólico de fermentação homoláctica a fermentação de ácidos mistos na bactéria Streptococcaceae *L. lactis* (Neves *et al.*, 2005), FBP, DHAP, GAP, bem como um metabolito característico de células limitadas em substrato, o 3-PGA, recorrendo a métodos espectrofotométricos (técnica enzimática específica para o metabolito em estudo). Uma análise detalhada dos resultados levou-nos a suspeitar de um efeito de saturação durante a determinação de absorvências no método de quantificação, o que veio de facto a comprovar-se com a repetição de algumas amostras em condições não saturantes. Infelizmente, devido a limitações de tempo não foi possível voltar a analisar todas as amostras obtidas.

Nesta fase é de salientar que o método utilizado combinando o procedimento de *quenching* com o de extracção, embora seja adequado para uma análise metabolómica direccionada, tal como aqui exemplificado com quantificação dos metabolitos glicolíticos, não é contudo apropriada para determinação de perfis metabólicos mais completa. Visto não ocorrer separação entre meio de cultivo/metabolitos extracelulares e metabolitos intracelulares, a amostra resultante é de grande complexidade, o que dificulta em muito a análise de metabolitos nos extractos por técnicas globais tais como a ressonância magnética nuclear ou a espectrometria de massa. Assim sendo, uma abordagem metabólica de carácter mais global requer o desenvolvimento de métodos de *quenching* celular que não afectem a integridade celular de pneumococos durante o processo de inactivação. Em face dos resultados documentados na literatura, talvez seja de experimentar outras combinações de soluções metanólicas (variação da natureza da solução tampão, do pH ou da força iónica). Adicionalmente, de forma a melhorar o processo e a aumentar a fiabilidade dos resultados sugere-se a incorporação de um dispositivo de amostragem automática, bem como a utilização de banhos com termostatização para temperaturas da ordem dos -60°C.

Embora longe de ser um estudo completo, este trabalho de tese permitiu obter informação valiosa sobre o metabolismo de glucose e galactose em *S. pneumoniae* R6. Mais ainda é um trabalho pioneiro numa área ainda pouco explorada, mas que se adivinha de grande importância na patogénese de *S. pneumoniae*.

## 5. Bibliografia

**Abbe, K., Takahashi, S. & Yamada, T. (1982).** Involvement of oxygen-sensitive pyruvate formate-lyase in mixed-acid fermentation by *Streptococcus mutans* under strictly anaerobic conditions. *J Bacteriol* **152**, 175-82.

**Abeyta M, Hardy G. G. & Yother J. (2003).** Genetic alteration of capsule type but not PspA type affects accessibility of surface-bound complement and surface antigens of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **71**, 218-25.

**Abranches, J., Chen, Y. Y. & Burne, R. A. (2004).** Galactose metabolism by *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol* **70**, 6047-52.

**Abranches, J., Nascimento, M. M., Zeng, L., Browngardt, C. M., Wen, Z. T., Rivera, M. F. & Burne, R. A. (2008).** CcpA regulates central metabolism and virulence gene expression in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* **190**, 2340-9.

**Avery, O. T., MacLeod, C. M. e McCarty, M. (1944).** Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *Mol Med* **1**, 344-65.

**Belanger, A. E., Clague, M. J., Glass, J. I. & Leblanc, D. J. (2004).** Pyruvate oxidase is a determinant of Avery's rough morphology. *J Bacterio* **1186**, 8164-71.

**Bogaert, D., De Groot, R. & Hermans, P.W. (2004).** *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* **4**, 144-54.

**Bolten, C. J., Kiefer, P., Letisse, F., Portais, J. C. & Wittmann, C. (2007).** Sampling for metabolome analysis of microorganisms. *Anal Chem* **79**, 3843-9.

**Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.

**Buchholz, A., Hurlebaus, J., Wandrey, C. & Takors, R. (2002).** Metabolomics: quantification of intracellular metabolite dynamics. *Bio Eng* **19**, 5-15.

**Buziol, S., Bashir, I., Baumeister, A., Claassen, W., Noisommit-Rizzi, N., Mailinger, W. & Reuss, M. (2002).** New bioreactor-coupled rapid stopped-flow sampling technique for measurements of metabolite dynamics on a subsecond time scale. *Biotechnol Bioeng* **80**, 632-6.

**Carvalho, S., Castro, R., Kuipers, O. P., Santos, H., Neves, A. R. (2008).** Metabolic characterization of *Streptococcus pneumoniae* D39 and its uncapsulated derivative R6. Poster communication presented at ISPPD-6, 6th International Symposium on Pneumococci & Pneumococcal Diseases, June 8 -12, 2008, Reykjavik (Iceland).

**Carvalho, S., Kloosterman, T., Kuipers, O. & Neves, A. R. (2009).** Regulon of the catabolite control of protein A (ccpA) in *Streptococcus pneumoniae*. Poster communication presented at EUROPNEUMO 2009, 9th European Meeting on the Molecular Biology of the Pneumococcus 4 -7, 2009, Berna (Switzerland).

**Castro, R. (2009).** Sugar metabolism in *Lactococcus lactis*. Tese Ph.D., Instituto Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

**Castro, R., Neves, A. R., Fonseca, L. L., Pool, W. A., Kok, J., Kuipers, O. P. & Santos, H. (2009).** Characterization of the individual glucose uptake systems of *Lactococcus lactis*: mannose-PTS, cellobiose-PTS and the novel GlcU permease. *Mol Microbiol* **71**, 795-806.

**Chassagnole C, Noisommit-Rizzi N, Schmid JW, Mauch K, Reuss M. (2002).** Dynamic modeling of the central carbon metabolism of *Escherichia coli* *Biotechnol Bioeng* **79**, 53-73.

**Czok, R. (1988).** D-Glycerate 3-phosphate. Em: Bergmeyer, H. U., Bergmeyer, J., Grabl, M. (Eds.). *Methods of enzymatic analysis* (pp. 537-541). Verlag Chemie, Weinheim.

**Dagan, R. (2009).** Pneumococcal Conjugate Vaccines Probe Studies: The Solution Points to the Problem. *Adv Exp Med Biol* **634**, 1-9.

**Deutscher, J., Francke, C. & Postma, P. W. (2006).** How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 939-1031.

**Dowson, C. G. (2004).** What is a Pneumococcus? Em: Tuomanen, E. I., Mitchell, T. J., Morrison, A. D. & S, B. G. (Eds). *The pneumococcus* (pp. 13-14). ASM Press, Washington D.C.

**Dowson, C. G. & Trzcinski, K. (2001).** Evolution and Epidemiology of Antibiotic-Resistant Pneumococci. Em: Lewis, K., Salyers, A.A., Taber, H.W., Wax, R.G. *Bacterial resistance to antimicrobials* (pp. 266-293). Marcel Dekker Inc, New York.

**Ehrmann, M., Ehrle, R., Hofmann, E., Boos, W. & Schlösser, A. (1998).** The ABC maltose transporter. *Mol Microbiol* **29**, 685-94.

**Even, S., Lindley, N. D. & Coccagn-Bousquet, M. (2001).** Molecular physiology of sugar catabolism in *Lactococcus lactis* IL1403. *J Bacteriol.* **183**, 3817-24.

**Faijes, M., Mars, A. E. & Smid, E. J. (2007).** Comparison of quenching and extraction methodologies for metabolome analysis of *Lactobacillus plantarum*. *Microb Cell Fact* **6**, 27.

**Garrigues, C., Loubiere, P., Lindley, N. D., Coccagn-Bousquet, M. (1997).** Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio. *J Bacteriol* **179**, 5282-7.

**Gonzalez, B., François, J. & Renaud, M. (1997).** A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast* **13**, 1347-55.

**Gray, B. M. & Musher, D. M. (2008).** The history of Pneumococcal Disease. Em: Siber, G. R., Klugman, K. P. & Mäkelä, P. H. (Eds). *Pneumococcal vaccines* (pp. 3-17). ASM Press, Washington D. C..

**Grossiord, B., Vaughan E. E., Luesink E. & de Vos, W. M. (1998).** Genetics of galactose utilisation via the Leloir pathway in lactic acid bacteria. *Lait* **78**, 77-84.

**Hajjaj, H., Blanc, P. J., Goma, G. & François, J. (1998).** Sampling techniques and comparative extraction procedures for quantitative determination of intra- and extracellular metabolites in filamentous fungi. *FEMS Microbiol* **164**, 195-200.

**Hava, D. L., LeMieux, J. & Camilli, A. (2003).** From nose to lung: the regulation behind *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol Microbiol* **50**, 1103-10.

**Hiller, J., Franco-Lara, E., Papaioannou, V. & Weuster-Botz, D. (2007).** Fast sampling and quenching procedures for microbial metabolic profiling. *Biotechnol Lett* **29**, 1161-7.

**Hoskins, J., Alborn, W. E., Jr., Arnold, J., Blaszcak, L. C., Burgett, S., DeHoff, B. S., Estrem, S. T., Fritz, L., Fu, D. J., Fuller, W., Geringer, C., Gilmour, R., Glass, J. S., Khoja, H., Kraft, A. R., Lagace, R. E., LeBlanc, D. J., Lee, L. N., Lefkowitz, E. J., Lu, J., Matsushima, P., McAhren, S. M., McHenney, M., McLeaster, K., Mundy, C. W., Nicas, T. I., Norris, F. H., O'Gara, M., Peery, R. B., Robertson, G. T., Rockey, P., Sun, P. M., Winkler, M. E., Yang, Y., Young-Bellido, M., Zhao, G., Zook, C. A., Baltz, R. H., Jaskunas, S. R., Rosteck, P. R., Jr., Skatrud, P. L., & Glass, J. I. (2001).** Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol* **183**, 5709-5717.

**Iyer, R., Baliga, N. S. & Camilli, A. (2005).** Catabolite control protein A (CcpA) contributes to virulence and regulation of sugar metabolism in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **187**, 8340-9.

**Iyer, R. & Camilli, A. (2007).** Sucrose metabolism contributes to in vivo fitness of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **66**, 1-13.

**Jahreis, K., Pimentel-Schmitt, E. F., Brückner, R., & Titgemeyer, F. (2008).** Ins and outs of glucose transport systems in eubacteria. *FEMS Microbiol Rev* **32**, 891-907.

**Jensen, N. B., Jokumsen, K. V. & Villadsen, J. (1999).** Determination of the phosphorylated sugars of the Embden-Meyerhoff-Parnas pathway in *Lactococcus lactis* using a fast sampling technique and solid phase extraction. *Biotechnol Bioeng* **63**, 356-62.

**Kadioglu, A. & Andrew, P. W. (2004).** The innate immune response to pneumococcal lung infection: the untold story. *Trends Immunol* **25**, 143-9.

**Kadioglu, A., Weiser J. N., Paton, J.C. & Andrew, P. W. (2008).** The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol* **6**: 288-301.

**King, S. J., Hippe, K. R. & Weiser, J. N. (2006).** Deglycosylation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidases expressed by *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **59**, 961-74.

**Koning, W. & van Dam, K. (1992).** A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. *Anal Biochem* **204**, 118-23.

**Lange, H. C., Eman, M., van Zuijlen, G., Visser, D., van Dam, J. C., Frank, J., de Mattos, M. J. & Heijnen, J. J. (2001).** Improved rapid sampling for in vivo kinetics of intracellular metabolites in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* **75**, 406-15.



**Lanie, J. A., Ng, W. L., Kazmierczak, K. M., Andrzejewski, T. M., Davidsen, T. M., Wayne, K. J., Tettelin, H., Glass, J. I., & Winkler, M. E. (2007).** Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. *J Bacteriol* **189**, 38-51.

**Le Belle, J. E., Harris, N. G., Williams, S. R. & Bhakoo, K. K. (2002).** A comparison of cell and tissue extraction techniques using high-resolution <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *NMR Biomed* **15**, 37-44

**López, R. (2006)** Pneumococcus: the sugar-coated bacteria. *Int Microbiol* **9**: 179-90.

**Lorca, G. L., Barabote, R. D., Zlotopolski, V., Tran, C., Winnen, B., Hvorup, R. N., Stonestrom, A. J., Nguyen, E., Huang, L. W., Kim, D. S. & Saier, M. H. Jr. (2007).** Transport capabilities of eleven gram-positive bacteria: comparative genomic analyses. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 1342-66.

**Loret, M. O., Pedersen, L. & François, J. (2007).** Revised procedures for yeast metabolites extraction: application to a glucose pulse to carbon-limited yeast cultures, which reveals a transient activation of the purine salvage pathway. *Yeast* **24**, 47-60

**Lowry, O. H., Carter, J., Ward, J. B. & Glaser, L. (1971).** The effect of carbon and nitrogen sources on the level of metabolic intermediates in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **246**, 6511-21.

**Luesink, E. J., van Herpen, R. E., Grossiord, B. P., Kuipers, O. P. & de Vos, W. M. (1998).** Transcriptional activation of the glycolytic *las* operon and catabolite repression of the *gal* operon in *Lactococcus lactis* are mediated by the catabolite control protein CcpA. *Mol Microbiol.* **30**, 789-98.

**Maharjan, R. P. & Ferenci, T. (2003).** Global metabolite analysis: the influence of extraction methodology on metabolome profiles of *Escherichia coli*. *Anal Biochem* **313**, 145-54.

**Mashego, M. R., Rumbold, K., De Mey, M., Vandamme, E., Soetaert, W. & Heijnen, J. J. (2007).** Microbial metabolomics: past, present and future methodologies. *Biotechnol Lett* **29**, 1-16.

**Mavroidi, A., Aanensen, D. M., Godoy, D., Skovsted, I. C., Kalltoft, M. S., Reeves, P. R., Bentley, S. D. & Spratt, B. G. (2007).** Genetic relatedness of the *Streptococcus pneumoniae* capsular biosynthetic loci. *J Bacteriol* **189**, 7841-55.

**Melchiorson, C. R., Jokumsen, K. V., Villadsen, J., Johnsen, M. G., Israelsen, H., Arnau, J. (2000).** Synthesis and posttranslational regulation of pyruvate formate-lyase in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* **182**, 4783-8.

**Michal, G. (1988).** D-Fructose 1,6-biphosphate, dihydroxyacetone phosphate and D-glyceraldehyde 3-phosphate. Em: Bergmeyer, H. U., Bergmeyer, J., Grabl, M. (Eds.). *Methods of enzymatic analysis* (pp. 342-350). Verlag Chemie, Weinheim.

**Mitchell, T. J. (2003).** The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat Rev Microbiol* **1**, 219-30.

**Monod, J. (1942).** Recherches sur la Croissance des cultures Bactériennes. Paris: Hermann et Cie.

**Mulas, L., Lannelli, F., Trappetti, C., Bidossi, A., Pozzi, G., Arioli, S., Mora, D., Hakenbeck, R., Tatti, E., Viti, C. & Oggioni, M. (2009).** Pneumococcal beta glucoside metabolism investigated by whole genome comparison. Poster communication presented at EUROPNEUMO 2009, 9th European Meeting on the Molecular Biology of the Pneumococcus 4 -7, 2009, Berna (Switzerland).

**Neves, R. (2001).** Metabolic fluxes to reroute carbon fluxes in *Lactococcus lactis*. Tese Ph.D., Instituto Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

**Neves, A. R., Pool, W. A., Kok, J., Kuipers, O. P. & Santos, H. (2005).** Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis* - the input from in vivo NMR. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 531-54.

**Neves, A. R., Ramos, A., Nunes, M. C., Kleerebezem, M., Hugenholtz, J., de Vos, W. M., Almeida, J. & Santos, H. (1999).** In vivo nuclear magnetic resonance studies of glycolytic kinetics in *Lactococcus lactis*. *Biotechnol Bioeng* **64**, 200-12.

**Nielsen J. (2001).** Metabolic engineering. *Appl Microbiol Biotechnol* **55**, 263-83.

**Nielsen, J. (2003).** It is all about metabolic fluxes. *J Bacteriol* **185**, 7031-5.

**Nunes, S., Sá-Leão, R. & de Lencastre, H. (2008).** Optochin resistance among *Streptococcus pneumoniae* strains colonizing healthy children in Portugal. *J Clin Microbiol* **46**, 321-4.

**Ogunniyi, A. D., Giammarinaro, P., & Paton, J. C. (2002).** The genes encoding virulence-associated proteins and the capsule of *Streptococcus pneumoniae* are upregulated and differentially expressed *in vivo*. *Microbiology* **148**, 2045-2053.

**Oldiges, M. & Takors, R. (2005).** Applying metabolic profiling techniques for stimulus-response experiments: chances and pitfalls. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **92**, 173-96.

**Poncet, S., Mijakovic, I., Nessler, S., Gueguen-Chaignon, V., Chaptal, V., Galinier, A., Boël, G., Mazé, A. & Deutscher, J. (2004).** HPrkinase/phosphorylase, a Walker motif A-containing bifunctional sensor enzyme controlling catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1697**, 123-35.

**Poolman, B. & Konings, W. N. (1993).** Secondary solute transport in bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1183**, 5-39.

**Poolman, B., Smid, E. J., Veldkamp, H. & Konings, W. N. (1987).** Bioenergetic consequences of lactose starvation for continuously cultured *Streptococcus cremoris*. *J Bacteriol.* **169**, 1460-8.

**Postma, P. W., Lengeler, J. W. & Jacobson, G. R. (1993).** Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev.* **57**, 543-94.

**Reinert, R. R. (2009).** The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* **3**, 7-11.

**Sá-Leão, R., Nunes, S., Brito-Avô, A., Frazão, N., Simões, A. S., Crisóstomo, M. I., Paulo, A. C., Saldanha, J., Santos-Sanches, I. & de Lencastre, H. (2009).** Changes in pneumococcal serotypes and antibiotypes carried by vaccinated and unvaccinated day-care centre attendees in Portugal, a country with widespread use of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Microbiol Infect* [Epub ahead of print].

**Saier, M. H. Jr., Chauvaux, S., Cook, G. M., Deutscher, J., Paulsen, I. T., Reizer, J. & Ye J. J. (1996).** Catabolite repression and inducer control in Gram-positive bacteria. *Microbiology.* **2**, 217-30.

**Schaefer, U., Boos, W., Takors, R. & Weuster-Botz, D. (1999).** Automated sampling device for monitoring intracellular metabolite dynamics. *Anal Biochem.* **270**, 88-96.

**Schleifer, K. H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Colins, M. D. & Fisher, W. (1985).** Transfer of *Streptococcus lactis* and related species to the genus *Lactococcus* gen. nov. *System Appl Microbiol* **6**, 183-95.

**Schaub, J., Schiesling, C., Reuss, M. & Dauner, M. (2006).** Integrated sampling procedure for metabolome analysis. *Biotechnol Prog* **22**, 1434-42.

**Shelburne, S. A., Davenport, M. T., Keith, D. B. & Musser, J. M. (2008).** The role of complex carbohydrate catabolism in the pathogenesis of invasive streptococci. *Trends Microbiol* **16**, 318-25.

**Theobald, U., Mailinger, W., Baltes, M., Rizz,i M. & Reuss M. (1997).** *In vivo* analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: I. Experimental observations. *Biotechnol Bioeng* **55**, 305-16.

**Tettelin, H., Nelson, K. E., Paulsen, I. T., Eisen, J. A., Read, T. D., Peterson, S., Heidelberg, J., DeBoy, R. T., Haft, D. H., Dodson, R. J., Durkin, A. S., Gwinn, M., Kolonay, J. F., Nelson, W. C., Peterson, J. D., Umayam, L. A., White, O., Salzberg, S. L., Lewis, M. R., Radune, D., Holtzapple, E., Khouri, H., Wolf, A. M., Utterback, T. R., Hansen, C. L., McDonald, L. A., Feldblyum, T. V., Angiuoli, S., Dickinson, T., Hickey, E. K., Holt, I. E., Loftus, B. J., Yang, F., Smith, H. O., Venter, J. C., Dougherty, B. A., Morrison, D. A., Hollingshead, S. K., & Fraser, C. M. (2001).** Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **293**, 498-506.

**Teuber, M., A., G. & Neves, H. (1992).** The genus *Lactococcus*. Em: Barlows, A., Tüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K. H. (Eds.). The Prokaryotes (pp. 137-1501). The Prokaryotes. Springer Verlag, Berlin.

**Titgemeyer, F. & Hillen, W. (2002).** Global control of sugar metabolism: a gram-positive solution. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**, 59-71.

**Thomas, T. D., Turner, K. W., & Crow, V. L. (1980).** Galactose fermentation by *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*: pathways, products, and regulation. *J Bacteriol* **144**, 672-682.

**Tuomanen, E. (2006).** *Streptococcus pneumoniae*. Em: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. & S, E. (Eds.). The Prokaryotes (pp. 149-162). Springer Science + Business Media, Nova York.

**Villas-Bôas, S. G., Mas, S., Akesson, M., Jorn, S. & Nielsen, J. (2004).** Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spect Rev* **24**, 613-646.

**Visser, D., van Zuylen, G. A., van Dam, J. C., Oudshoorn, A., Eman, M. R., Ras, C., van Gulik, W. M., Frank, J., van Dedem, G. W. & Heijnen, J. J. (2002).** Rapid

sampling for analysis of in vivo kinetics using the BioScope: a system for continuous-pulse experiments. *Biotechnol Bioeng* **79**, 674-81.

**Warner, J. B. & Lolkema, J. S. (2003).** CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 475-90.

**Wegmann, U., O'Connell-Motherway, M., Zomer, A., Buist, G., Shearman, C., Canchaya, C., Ventura, M., Goesmann, A., Gasson, M. J., Kuipers, O. P., van Sinderen, D. & Kok, J. (2007).** Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J Bacteriol* **189**, 3256-70.

**Wellerdiek, M., Winterhoff, D., Reule, W., Brandner, J. & Oldiges, M. (2008).** Metabolic quenching of *Corynebacterium glutamicum*: efficiency of methods and impact of cold shock. *Bioprocess Biosyst Eng* **32**, 581-92.

**Wittmann, C., Krömer, J. O., Kiefer, P., Binz, T. & Heinzle, E. (2004).** Impact of the cold shock phenomenon on quantification of intracellular metabolites in bacteria. *Anal Biochem* **327**, 135-9.

**Winder, C. L., Dunn, W. B., Schuler, S. Broadhurst, D., Jarvis, R. Stephens, G. M. & Goodacre, R. (2008).** Global metabolic profiling of *Escherichia coli* cultures: an evaluation of methods for quenching and extraction of intracellular metabolites. *Anal Chem* **80**, 2939-48.

**Yamada, T., Abbe-Takahashi, S. & Abbe, K. (1985).** Effects of oxygen on pyruvate formate-lyase *in situ* and sugar metabolism of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *Infect Imm* **47**, 129-134.

**Yesilkaya, H., Spissu, F., Carvalho, S. M., Terra, V. S., Homer, K. A., Benisty, R., Porat, N., Neves, A. R. & Andrew, P. W. (2009).** Pyruvate formate lyase is required for pneumococcal fermentative metabolism and virulence. *Infect Immun* [Epub ahead of print].

**Zhu, J. & Shimizu, K. (2004).** The effect of pfl gene knockout on the metabolism for optically pure D-lactate production by *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**, 367-75.

**Zomer, A. L., Buist, G., Larsen, R., Kok, J. & Kuipers, O. P. (2007).** Time-resolved determination of the CcpA regulon of *Lactococcus lactis* subsp. cremoris MG1363. *J Bacteriol* **189**, 1366-81.

# ANEXO 1



**Tabela 1.** Composição do meio quimicamente definido (CDM) (Neves *et al.*, 1999) usado no crescimento de *S. penumoniae* em condições de pH e atmosfera não controladas.

Componentes	Concentração (g L <sup>-1</sup> )	Componentes	Concentração (g L <sup>-1</sup> )
Na <sub>2</sub> -β-glicerofosfato	21	Cholina-HCl	0,01
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,8	Piruvato de sódio	0,1
Acetato de sódio	1,0		
Citrato de amônio	0,6		
<b>Vitaminas (10<sup>-3</sup>)</b>		<b>Aminoácidos</b>	
Na- <i>p</i> -Aminobenzoato	5,	Alanina	0,24
D-Biotina	2,5	Arginina	0,13
Ácido Fólico	1,0	Asparagina	0,35
Ácido nicotínico	1,0	Aspartato	0,40
Pantotenato de cálcio	1,0	Cisteína-HCl	0,40
Piridoxamina-HCl	2,5	Glutamato	0,50
Piridoxina-HCl	2,0	Glutamina	0,39
Riboflavina	1,0	Glicina	0,18
Tiamina-HCl	1,0	Histidina	0,15
DL-6,8-Ácido teióico	1,5	Isoleucina	0,21
Vitamina B <sub>12</sub>	1,0	Leucina	0,46
<b>Bases Nitrogenadas (10<sup>-2</sup>)</b>		Lisina	0,44
Adenina	1,0	Metionina	0,13
Guanina	1,0	Fenilalanina	0,28
Uracilo	1,0	Prolina	0,68
Xantina	1,0	Serina	0,34
<b>Micronutrientes (10<sup>-1</sup>)</b>		Treonina	0,22
MgCl <sub>2</sub>	2,0	Triptofano	0,05
CaCl <sub>2</sub>	0,4	Valina	0,33
ZnSO <sub>4</sub>	0,05		

### **Protocolo 1: Optimização de processos de *quenching* (Faijes *et al.*, 2007)**

1- Soluções de *quenching*: 60% metanol/0,85% carbonato de amónia (pH 5,5) a -40°C

60% metanol a -40°C

Metanol absoluto a -20°C

Solução de extracção: Metanol absoluto a -80°C

- a) Transferir rapidamente (com uma seringa) 50 mL de cultura para tubos de centrífuga contendo 150 mL de solução de *quenching*. Para equilibrar o tubo de centrífuga com amostra, encher um outro com água;
- b) Manter os tubos em gelo até chegar à centrífuga;
- c) Centrifugar a 7000 rpm durante 7 minutos a 2°C;
- d) Recolher o sobrenadante para controlo de eventuais perdas durante o processo de *quenching*.
- e) Ressuspender o sedimento celular em 10 mL de metanol absoluto a -80°C (manter sempre que possível a amostra em gelo);
- f) Centrifugar a 18000 rpm durante 5 minutos, a 2°C;
- g) Recolher o sobrenadante para um balão de liofilização;
- h) Lavar os sedimentos e centrifugar (18000 rpm durante 5 minutos, a 2°C) duas vezes com 5 mL de metanol absoluto a -80°C e duas vezes com 5 mL de água destilada a 4°C; Combinar os sobrenadantes;
- i) Rotavapor;
- j) Liofilização;
- k) O liofilizado foi dissolvido num volume conhecido de H<sub>2</sub>O (volume mínimo de H<sub>2</sub>O) e o pH ajustado a 6,5;
- l) Guardam-se as amostras a -20°C.

## **Protocolo 2: Optimização de processos de extracção (Faijes *et al.*, 2007)**

### **1- *Extracção metanólica:***

Solução de *quenching*: 60% metanol a -40 

Solução de extracção: 60% metanol a -80 

- a) Transferir rapidamente (com uma seringa) 50 mL de cultura para tubos de centrífuga contendo 150 mL de 60% metanol a -40  em banho de azoto líquido. Para equilibrar o tubo de centrífuga com amostra, encher um outro com água;
- b) Manter os tubos em gelo até chegar   centrífuga;
- c) Centrifugar a 7000 rpm durante 7 minutos a 2 C;
- d) Recolher o sobrenadante para controlo de eventuais perdas durante o processo de quenching.
- e) Ressuspender o sedimento celular em 10 mL de metanol absoluto a -80 C (manter sempre que possível a amostra em gelo);
- f) Centrifugar a 18000 rpm durante 5 minutos, a 2 C;
- g) Recolher o sobrenadante para um balão de liofilização;
- h) Lavar os sedimentos e centrifugar (18000 rpm durante 5 minutos, a 2 C) duas vezes com 5 mL de metanol absoluto a -80 C e duas vezes com 5 mL de água destilada a 4 C; Combinar os sobrenadantes;
- i) Rotavapor;
- j) Liofilização;
- k) O liofilizado foi dissolvido num volume conhecido de H<sub>2</sub>O (volume mínimo de H<sub>2</sub>O) e o pH ajustado a 6,5;
- l) Guardam-se as amostras a -20 C.

### **2- *Extracção etanólica a quente:***

Solução de *quenching*: 60% metanol a -40 

Solução de extracção: 80% etanol

- a) Transferir rapidamente (com uma seringa) 50 mL de cultura para tubos de centrífuga contendo 150 mL de 60% metanol a -40  em banho de azoto líquido. Para equilibrar o tubo de centrífuga com amostra, encher um outro com água;
- b) Manter os tubos em gelo até chegar   centrífuga;
- c) Centrifugar a 7000 rpm durante 7 minutos a 2 C;

- d) Ressuspender o sedimento em 3 mL de água destilada;
- e) Transferir para um balão de liofilização contendo 10 mL de etanol a 80% (v/v) e proceder a ebulição num banho a 90°C durante 10 minutos;
- f) Centrifugar a 18000 rpm durante 10 minutos a 4°C;
- g) Recolher o sobrenadante para um balão de liofilização;
- h) Ressuspender o sedimento celular em 5 mL de etanol a 80% e proceder a ebulição num banho a 90°C durante 10 minutos;
- i) Centrifugar a 18000 rpm durante 10 minutos a 4°C;
- j) Combinar os sobrenadantes;
- k) Rotavapor;
- l) Liofilização;
- m) O liofilizado foi dissolvido num volume conhecido de H<sub>2</sub>O (volume mínimo de H<sub>2</sub>O) e o pH ajustado a 6,5;
- n) Guardam-se as amostras a -20°C.

### 3- *Extracção perclórica:*

Solução de *quenching*: 60% metanol a -40%

Solução de extracção: ácido Perclórico

- a) Transferir rapidamente (com uma seringa) 50 mL de cultura para tubos de centrífuga contendo 150 mL de 60% metanol a -40% em banho de azoto líquido. Para equilibrar o tubo de centrifuga com amostra, encher um outro com água;
- b) Manter os tubos em gelo até chegar à centrífuga;
- c) Centrifugar a 7000 rpm durante 7 minutos a 2°C;
- d) Ressuspender o sedimento celular em 10 mL de MOPS 2,5 mM (pH 7,0, 4°C) e transferir para 1,2 mL de uma solução de ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) 6 M (concentração final 0,6 M);
- e) A suspensão é colocada num balão de Erlenmeyer e incubada em gelo durante 20 minutos, com agitação;
- f) O extracto é neutralizado com a adição de KOH 5 M;
- g) Centrifugar a 18000 rpm durante 40 minutos a 4°C;
- h) Liofilização;
- i) O liofilizado foi dissolvido num volume conhecido de H<sub>2</sub>O (volume mínimo de H<sub>2</sub>O) e o pH ajustado a 6,5;
- j) Guardam-se as amostras a -20°C.

### **Protocolo 3: Diferentes extracções perclóricas**

#### *1- Quenching celular seguido de extracção perclórica:*

- a) Transferir rapidamente (com uma seringa) 50 mL de cultura para tubos de centrífuga contendo 150 mL de 60% metanol a -40% em banho de azoto líquido. Para equilibrar o tubo de centrifuga com amostra, encher um outro com água;
- b) Manter os tubos em gelo até chegar à centrífuga;
- c) Centrifugar a 7000 rpm durante 7 minutos a 2°C;
- d) Ressuspender o sedimento celular em 10 mL de MOPS 2,5 mM (pH 7,0, 4°C) e transferir para 1,2 mL de uma solução de ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) 6 M (concentração final 0,6 M);
- e) A suspensão é colocada num balão de Erlenmeyer e incubada em gelo durante 20 minutos, com agitação;
- f) O extracto é neutralizado com a adição de KOH 5 M;
- g) Centrifugar a 18000 rpm durante 40 minutos a 4°C;
- h) Liofilização;
- i) O liofilizado foi dissolvido num volume conhecido de H<sub>2</sub>O (volume mínimo de H<sub>2</sub>O) e o pH ajustado a 6,5.

#### *3- Extracção perclórica tradicional:*

- a) Transferir rapidamente (com uma seringa) 50 mL de cultura para tubos de centrífuga. Para equilibrar o tubo de centrifuga com amostra, encher um outro com água;
- b) Manter os tubos em gelo até chegar à centrífuga;
- c) Centrifugar a 7000 rpm durante 7 minutos a 2°C;
- d) Ressuspender o sedimento celular em 10 mL de MOPS 2,5 mM (pH 7,0, 4°C) e transferir para 1,2 mL de uma solução de ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) 6 M (concentração final 0,6 M);
- e) A suspensão é colocada num balão de Erlenmeyer e incubada em gelo durante 20 minutos, com agitação;
- f) O extracto é neutralizado com a adição de KOH 5 M;
- g) Centrifugar a 18000 rpm durante 40 minutos a 4°C;
- h) Liofilização;

- i) O liofilizado foi dissolvido num volume conhecido de H<sub>2</sub>O (volume mínimo de H<sub>2</sub>O) e o pH ajustado a 6,5.

2- *Extracção perclórica directa:*

- a) Transferir imediatamente 50 mL de cultura para um Erlenmeyer com 5,6 mL de HClO<sub>4</sub> 6 M (concentração final 0,6 M) e incubar em gelo durante 20 minutos, com agitação;
- b) O extracto é neutralizado com a adição de KOH 5 M;
- c) Centrifugar a 18000 rpm durante 40 minutos a 4°C;
- d) Liofilização;
- e) O liofilizado foi dissolvido num volume conhecido de H<sub>2</sub>O (volume mínimo de H<sub>2</sub>O) e o pH ajustado a 6,5;
- f) Guardam-se as amostras a -20°C.

#### **Protocolo 4: Quantificação de metabolitos intracelulares por métodos enzimáticos.**

##### 1- Quantificação da DHAP, GAP e FBP:

Mistura de reacção: (as concentrações dão as das soluções stock)

- Tampão: TEA 0,4 mol/L, pH 7,6; EDTA, 40mmol/L;
- $\beta$ -NADH 51,7 mmol/L;
- GDH 40 KU/L;
- TIM 250 KU/L;
- Aldolase 13,5 KU/L.

Pipetar sucessivamente para células de plástico	
Tampão	0,750 mL
Amostra	0,750 mL
Solução de NADH	0,750 mL
Misturar, esperar que atinja a temperatura ambiente e ler a absorvência inicial $A_1$ ; três vezes em intervalos de 3 minutos	
Suspensão de GDH	0,005 mL
Misturar, depois da reacção ocorrer (7 minutos) ler as absorvências iniciais $A_2$ ; três vezes em intervalos de 3 minutos; $A_1 - A_2 = A_{\text{GHAP}}$	
Suspensão de TIM	0,005 mL
Misturar, depois da reacção ocorrer (5 minutos) ler as absorvências iniciais $A_3$ ; três vezes em intervalos de 3 minutos; $A_2 - A_3 = A_{\text{DAP}}$	
Suspensão de Aldolase	0,005 mL
Misturar, depois da reacção ocorrer (5 minutos) ler as absorvências iniciais $A_4$ ; três vezes em intervalos de 3 minutos; $A_3 - A_4 = A_{\text{FBP}}$	

## 2- Quantificação da 3-PGA:

Mistura de reacção: (as concentrações dão as das soluções stock)

- Tampão: TEA 0,5 mol/L, pH 7,6; EDTA, 5mmol/L;
- $\beta$ -NADH 6 mmol/L;
- $\text{MgSO}_4$  (Sulfato de Magnésio) 400 mmol/L;
- ATP 350 mM;
- GAPDH 360 KU/L;
- TIM 4800 KU/L;
- GDH 80 KU/L;
- PK 1800 KU/L;

Pipetar sucessivamente para dentro de células de plástico	
Extracto	0,80 mL
Tampão	0,20mL
Solução NADH	0,02 mL
Solução de $\text{MgSO}_4$	0,02 mL
Solução de ATP	0,02 mL
Suspensão de GAPDH	0,01 mL
Suspensão de TIM	0,005 mL
Suspensão de GDH	0,01 mL
Misturar; esperar que atinja a temperatura ambiente; registar absorvências a 5,10 e 15 minutos $A_1$	
Solução de PGK	0,01 mL
Misturar; esperar que atinja a temperatura ambiente; registar absorvências a 15,20 e 25 minutos $A_2$	